



SUELLEN FINAMOR MOTA

**VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. NO
FEIJOEIRO COMUM**

LAVRAS – MG

2013

SUELLEN FINAMOR MOTA

VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. NO FEIJOEIRO COMUM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Mota, Suellen Finamor.

Variabilidade de *Colletotrichum* spp. no feijoeiro comum /
Suellen Finamor Mota. – Lavras : UFLA, 2013.
92 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Elaine Aparecida de Souza.
Bibliografia.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. Variabilidade genética. 3.
Colletotrichum truncatum. 4. Sarna do feijoeiro. 5. Antracnose. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

SUELLEN FINAMOR MOTA

VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. NO FEIJOEIRO COMUM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de julho de 2013.

Dra. Marisa Vieira de Queiroz

UFV

Dra. Quélen de Lima Barcelos

UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

*Aos meus pais, Silvino e Marley, pelo amor, compreensão, apoio e paciência;
À minha irmã, Samira, pelo companheirismo de toda vida e por toda paciência
e amor!
À tia. Márcia, (in memoriam) que sempre estará em meu coração..*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está à frente de toda a minha Vida!

Aos meus pais, pelo apoio, sofrimento, dificuldades e alegrias que passamos ao longo do curso;

A minha irmã, Samira, pela confiança e por acreditar na minha capacidade de realizar meus sonhos;

Ao meu namorado, Ricardo, que esteve sempre me ajudando e apoiando, principalmente nas horas mais difíceis. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o Mestrado;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil;

À professora e orientadora, Elaine Aparecida de Souza, pelos conselhos valiosos, compreensão, ensinamentos e amizade nesses anos de convivência;

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições ao trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos;

À Universidade Federal de Viçosa, no nome da Professora Marisa que permitiu a realização de parte do meu trabalho e aos membros do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, por toda ajuda e paciência, principalmente ao Mateus, que me ensinou e me acompanhou nesse tempo. Os meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Rafael, Samira, Mariana, Tânia, Lucas, Francine, Larissa Carvalho, Paula, Alex, Paulo e Larissa, pela ajuda, conselhos, sugestões e convivência diária;

Agradecimento especial à Marina Andrade, por toda ajuda, que foi indispensável para a realização deste trabalho;

A grande amiga Joyce, que me ensinou tudo e mais um pouco, que sempre esteve presente para me ajudar e que me fez apaixonar pelo meu trabalho. Com sua amizade tudo fica mais fácil, e sinto enorme orgulho em ter sido sua orientada;

As amigas de República e demais amigos, por toda ajuda e amizade nos momentos felizes e também nos momentos difíceis;

Aos meus familiares e amigos, por estarem sempre presentes na minha vida e sempre compreenderem minhas ausências.

Ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade, auxílio e grande amizade. E também aos colegas do Laboratório de Genética Molecular por toda ajuda;

Aos funcionários do DBI, Zélia, Rafaela, Irondina e Du, pela convivência e auxílio durante o curso;

A todos os colegas do GEN que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização desse trabalho e pela excelente convivência;

Principalmente as amigas, Gaby e Lets, que fizeram as disciplinas do mestrado ser mais agradáveis!

A cada um dos meus amigos eternos de graduação, que deixaram saudades da convivência diária e maravilhosa, quando tudo se iniciou;

A todos aqueles que lutaram, pensaram ou agiram em meu favor, obrigada por existirem.

RESUMO

O Gênero *Colletotrichum* apresenta ampla variabilidade genética, demonstrada pela ocorrência de diversas raças patogênicas e características fenotípicas. O objetivo com este trabalho foi caracterizar 22 isolados de *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões de antracnose e de sarna do feijoeiro e também, verificar a relação entre essas espécies do gênero *Colletotrichum* que habitam lesões de antracnose e sarna do feijoeiro. A caracterização foi realizada por meio da morfologia das colônias, tamanho dos conídios, presença de septo, germinação, taxa de esporulação e crescimento micelial, marcadores moleculares por PCR dos genes mating- type e Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) e também, testes de patogenicidade. Os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram ampla variabilidade para todas as características avaliadas, evidenciando a ocorrência de múltiplas espécies. A partir do teste de patogenicidade, verificamos que a avaliação da severidade da doença causada pelos isolados de *Colletotrichum* spp., deve ser realizada tardiamente, ou seja, aos 17 dias. Na análise molecular, apenas os isolados de *C. lindemuthianum* foram agrupados pelo marcador IRAP. Para os caracteres fisiológicos, observou-se que o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* é bem mais lento que dos demais isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados. As relevantes informações geradas no estudo confirmam a variabilidade existente nas espécies e direcionam futuros estudos na área básica desses patógenos na área aplicada no controle das doenças do feijoeiro.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*. Variabilidade genética. *Colletotrichum truncatum*. Sarna do feijoeiro. Antracnose.

ABSTRACT

The *Colletotrichum* genus presents a large genetic variability, as is demonstrated by the occurrence of several pathogenic races and phenotypic characteristics. The objective of this study was to characterize 22 *C. lindemuthianum* and *Colletotrichum* spp. isolates recovered from anthracnose lesions and bean scab, and also to verify the relation between these species from the *Colletotrichum* genus, which inhabit anthracnose and scab lesions. The characterization was performed by analyzing colony morphology, conidia size, the presence of septa, germination, sporulation and mycelia growth rates, in addition to the PCR of mating-type genes, IRAP markers and pathogenicity tests. The *Colletotrichum* spp. isolates presented a wide variation to all the evaluated characteristics, showing the occurrence of multiple species. With the pathogenicity tests, we verified that the evaluation of the severity of the disease caused by *Colletotrichum* spp. isolates must be performed 17 days after inoculation. On the molecular analysis, only the *C. lindemuthianum* isolates were grouped by the IRAP markers. For the physiological characters, we observed that *C. lindemuthianum* mycelia growth is much slower than that of the evaluated *Colletotrichum* spp. isolates. The relevant information generated in this study confirms the variability in the species and direct future studies to the basic and applied area of bean disease control.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*. Genetic variability. *Colletotrichum truncatum*. Scab bean. Anthracnose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Placas dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	45
Figura 2	Formato dos conídios e ascósporos.....	48
Figura 3	Conídios septados na germinação.....	50
Figura 4	Formação de CATs	54
Figura 5	Sintoma causado por <i>Colletotrichum</i> em caules de feijão aos 17 dias após a inoculação na cultivar Majestoso.....	58
Figura 6	Sintoma causado por <i>Colletotrichum</i> em folha de feijão aos 17 dias após a inoculação na cultivar Majestoso	59
Figura 7	Sintoma da doença causada por <i>Colletotrichum</i> no caule da soja aos 17 dias após a inoculação na cultivar CD237	59
Figura 8	Sintoma causado por <i>Colletotrichum</i> em folha de soja aos 17 dias após a inoculação na cultivar CD237	60
Figura 9	Plantas do feijoeiro infectadas naturalmente	60
Figura 10	Sintoma causado por <i>Colletotrichum</i> em vagens de feijão da cultivar Talismã.....	61
Figura 11	Dendrograma de similaridade genética usando marcados IRAP de 22 isolados de <i>Colletotrichum</i>	63
Figura 12	Perfil de bandas polimórficas para o par de <i>primers</i> IRAP2/IRAP4 para os isolados que causaram a sarna no feijoeiro.....	64
Figura 13	Perfil de Bandas IRAP para o isolado inoculado G89-1 e os obtidos por reisolamento (R1, R2, R3 e R4).....	65
Figura 14	Placas dos pareamentos mostrando a linha de contato e a formação de peritécios.....	66

Figura 15	Dendograma de similaridade para a compatibilidade entre os 22 isolados de <i>Colletotrichum</i>	67
-----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Código dos 22 isolados, raça, Cultura, doença proveniente e local de origem dos 22 isolados analisados	35
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados nas análises de IRAP	41
Tabela 3	Estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para o diâmetro colonial (mm), IVCN (mm/dia), e taxa de esporulação aos 14, 15 e 16 dias de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos a partir de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro	46
Tabela 4	Morfologia de conídios e estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para dimensão dos conídios (μm), anastomose entre conídios (%) e germinação de conídios as 24 e 48 horas dias de isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos a partir de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro	52
Tabela 5	Notas médias da severidade da doença em cultivares de feijoeiro e de soja inoculadas com diferentes isolados de <i>Colletotrichum</i> pela relação isolado dentro de cultivar	55
Tabela 6	Notas médias da severidade da doença de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> avaliados aos 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação pela relação isolado dentro de dias	57
Tabela 7	Notas médias da severidade da doença de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> avaliados aos 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação pela relação dias dentro de isolados.....	57

Tabela 8	Reações de compatibilidade entre os 22 isolados de <i>Colletotrichum</i> e a proporção de reações compatíveis (%) para cada isolado.....	68
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Feijoeiro comum.....	14
2.2	Antracnose do feijoeiro	15
2.3	Sarna.....	16
2.4	<i>Colletotrichum</i>	18
2.4.1	Origem da variabilidade	22
2.4.2	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	26
2.4.3	<i>Colletotrichum truncatum</i>	29
2.5	Marcadores IRAP/REMAP	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Isolamento e condições de cultivo	35
3.2	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial.....	36
3.3	Capacidade de esporulação.....	36
3.4	Caracterização dos conídios, porcentagem de germinação e anastomose entre conídios.....	37
3.5	Teste de patogenicidade	38
3.6	Compatibilidade sexual e micelial.....	39
3.7	A Extração DNA.....	40
3.8	Análises de PCR genes Mating-type	40
3.9	Marcador IRAP.....	41
3.10	Análises Estatísticas	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Morfologia da Colônia	44
4.2	Índice de velocidade de crescimento Micelial (IVCM) e Diâmetro Colonial.....	45
4.3	Caracterização dos conídios.....	47
4.4	Taxa de esporulação	48
4.5	Germinação	49
4.6	Anastomose entre conídios	51
4.7	Teste de Patogenicidade	54
4.8	PCR gene Mating type	61
4.9	Marcador IRAP.....	62

4.10	Compatibilidade Sexual e Micelial	65
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A antracnose do feijoeiro é uma das doenças fúngicas que se destaca provocando grandes perdas na produtividade e na qualidade dos grãos. A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, forma anamórfica. Nas folhas, as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escura a negra. No pecíolo e no caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por uma borda de coloração laranja-avermelhada. Sob temperatura e umidade adequadas, observa-se a esporulação rosada no centro das lesões (SARTORATO, 1988). Nos últimos anos têm sido obtidas linhagens de *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* (forma teleomórfica) a partir de lesões de antracnose (PINTO, 2012). Essas linhagens têm sido investigadas por meio de caracterização, morfológica, citológica e molecular (BARCELOS, 2010; PINTO, 2012) e os resultados obtidos indicam se tratar de outra espécie, ou seja, não a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* (BARCELOS; SOUZA; VAILLANCOURT, 2011). Na população avaliada por essas autoras, a maioria das linhagens mostrou-se não patogênicas, no entanto, algumas linhagens se destacaram por apresentarem sintomas brandos nas nervuras das folhas e caules de plântulas inoculadas de feijoeiro. Essas linhagens foram obtidas a partir de culturas monoascospóricas e apresentaram colônias conidiais. É importante que essas linhagens sejam avaliadas detalhadamente nos testes de patogenicidade uma vez que co-habitam lesões de antracnose.

Além da antracnose, nos campos experimentais dos programas de melhoramento do feijoeiro tem sido observada a ocorrência de sarna e as duas doenças ocorrendo simultaneamente nos mesmos tecidos vegetais. Nestes

tecidos, os sintomas se confundem principalmente nas folhas e caules. Os primeiros sintomas da sarna podem iniciar-se ainda no estágio de plântula com a formação de uma zona de tecido mais clara pouco acima da região do colo da planta. Com o desenvolvimento da doença o tecido torna-se necrosado apresentando uma coloração castanha. Estas lesões crescem no sentido longitudinal do caule e aumentam de tamanho podendo tomar todo o seu diâmetro. Nas vagens, surgem pequenas manchas negras, nas quais também contém os acérvulos do fungo (COSTA et al., 2001). As informações sobre a sarna do feijoeiro são escassas e torna-se necessária uma investigação criteriosa sobre *Colletotrichum truncatum*, relatado como o agente causal.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar isolados de *C. lindemuthianum* e isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões de antracnose e de sarna do feijoeiro por meio de caracteres morfológicos, citológicos, fisiológicos, marcadores moleculares e testes de patogenicidade, e também, verificar a relação entre essas espécies do gênero *Colletotrichum* que habitam lesões de antracnose e sarna do feijoeiro. Essas informações são importantes para o conhecimento das interações entre esses patossistemas e para os programas de melhoramento do feijoeiro visando à obtenção de cultivares resistentes a essas doenças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijoeiro comum

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos componentes básicos da dieta alimentar em países em desenvolvimento das regiões subtropicais, sendo uma importante fonte de proteínas, carboidratos, ferro e fibra alimentar, especialmente para a população de baixa renda (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa, com produção anual de 2,86 milhões de toneladas (BRASIL, 2013). Os principais produtores são os estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Goiás (BARBOSA; GONZAGA, 2012). No entanto, a produtividade média do feijoeiro em todo o território nacional ainda está muito aquém de seu potencial produtivo, com rendimento de 940 kg/ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013), devido a uma série de fatores bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam os problemas fitossanitários, que acarretam perdas para a qualidade e a produtividade do feijoeiro (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Entre os fatores limitantes, que contribuem para a redução da produtividade, a instabilidade e o alto risco da implantação da cultura estão às doenças. Dentre as doenças fúngicas, as mais comuns são: Antracnose, mancha angular, mofo-branco, ferrugem, murcha-de-fusarium e uma nova doença denominada sarna (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012).

As doenças fúngicas têm exigido a aplicação frequente de fungicidas, contribuindo para elevar o custo da produção, a contaminação dos produtores e do ambiente. Assim, como alternativas no controle das doenças, destacam-se a obtenção de cultivares resistentes, o uso de sementes sadias e a rotação de

culturas (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). No entanto, um fator limitante na obtenção de cultivares resistentes é que na maioria dos casos a vida útil da cultivar resistente é pequena, uma vez que o patógeno possui grande variabilidade e “quebra” a resistência obtida (BORÉM; MIRANDA, 2005).

2.2 Antracnose do feijoeiro

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro-comum em regiões subtropicais e temperadas, especialmente em localidades com temperaturas moderadas a frias (13 °-27 °C) e alta umidade relativa (acima de 91%) (KIMATI, 1997). As perdas ocasionadas por esta doença podem ser da ordem de 100%, principalmente quando sementes contaminadas ou cultivares suscetíveis são utilizados para plantio e ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (CHAVES, 1980). Além de diminuir o rendimento da cultura, os sintomas da antracnose depreciam a qualidade do produto, por ocasionarem manchas nos grãos, tornando-os impróprios para o consumo (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

Os sintomas da antracnose aparecem em todos os estágios de crescimento, na parte aérea da planta a partir de cinco dias do contato com o fungo (CHAVES, 1980; KIMATI, 1997). O patógeno pode afetar as sementes, produzindo lesões nos tecidos dos cotilédones. As sementes infectadas são ligeiramente descoloridas, podendo apresentar cancrios, cuja coloração varia de amarela a café-escuro ou negra (SARTORATO, 1988; SCHAWARTZ, 1994). No pecíolo e no caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura (SARTORATO, 1988). Nas folhas, as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escuro a negra. Nas vagens, as lesões são

arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por uma borda de coloração laranja-avermelhada. Essas lesões podem coalescer e cobrir parcialmente as vagens. Sob temperatura e umidade adequadas, observa-se a esporulação rosada no centro das lesões (SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994).

O agente causal da antracnose é conhecido por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav. e a disseminação deste patógeno ocorre a curta distância por meio de respingos de chuvas, implementos agrícolas, homem, insetos e vários outros agentes, e a longa distância, por meio de sementes infectadas (VIEIRA; VIEIRA; RAMOS, 1993). Essas sementes representam a maior fonte de inóculo do ponto de vista epidemiológico, além de promover o intercâmbio de diferentes raças entre as diversas regiões produtoras (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; SILVA, 2004). O patógeno sobrevive de uma estação a outra, ou de um cultivo a outro, como micélio dormiente no interior do tegumento da semente nas células dos cotilédones ou em restos culturais, na forma de esporos (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Para o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose, algumas informações são necessárias, entre elas destacamos o conhecimento dos níveis de variabilidade dentro e entre populações do patógeno e a determinação das raças predominantes em cada região de cultivo do feijoeiro comum (PINTO et al., 2010; RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2003).

2.3 Sarna

A sarna do feijoeiro comum é uma doença identificada recentemente na cultura do feijoeiro, podendo causar perdas em até 100% da lavoura. Encontrase distribuída principalmente nos Estados de Goiás e Minas Gerais. Os primeiros

sintomas da sarna podem iniciar-se ainda no estágio de plântula com a formação de uma zona de tecido mais clara pouco acima da região do colo da planta. À medida que a doença se desenvolve o tecido torna-se necrosado apresentando uma coloração castanha. Estas lesões crescem no sentido longitudinal do caule e aumentam de tamanho podendo tomar todo o seu diâmetro. Posteriormente, nas áreas necrosadas pode ser observado um grande número de acérvulos, que são estruturas de reprodução assexual do patógeno. Quando estes sintomas ocorrem, as plantas murcham e morrem. Nas vagens, surgem pequenas manchas negras, nas quais também contém os acérvulos do fungo. Por ser uma doença detectada recentemente na cultura do feijoeiro comum, ainda não são conhecidas às medidas de controle. Entretanto, como o fungo pode ser transmitido pelas sementes, recomenda-se o emprego de sementes de boa qualidade fitossanitária. Recomenda-se, também, não cultivar o feijoeiro no sistema de plantio direto após a cultura de milho ou sorgo, se houver histórico da doença (SARTORATO, 2002).

O agente causal da sarna é denominado *Colletotrichum truncatum*. Testes de patogenicidades foram realizados na Embrapa utilizando isolados de *C. truncatum* e *Colletotrichum graminicola*, provenientes do sorgo e do milho. Constatou-se que esse novo patógeno é extremamente agressivo, sendo patogênico às três culturas enquanto que os isolados de *C. graminicola* não se mostraram aptos a causar sintomas no feijoeiro. Além desses, outros testes de patogenicidade foram realizados, inoculando o fungo em plantas da cultivar Pérola com 40 dias de idade. Os sintomas foram avaliados após 12 dias de incubação e o fungo foi reisolado, completando-se os postulados de Koch, uma exigência científica para associar um patógeno a uma determinada doença (COSTA et al., 2001).

O patógeno também causa doença em outras espécies, como soja, lentilha e feijão-fava, no entanto, nestes casos, a doença é denominada

antracnose. Já no feijão-caupi a doença é chamada mancha-café. Em soja, a doença pode causar a morte das plântulas, necrose dos pecíolos e manchas nas folhas, hastes e vagens. Inóculo proveniente de restos de cultura e sementes infectadas podem causar necrose nos cotilédones, que pode se estender para o hipocótilo. O fungo afeta a planta em qualquer estágio de desenvolvimento podendo causar queda total das vagens ou deterioração total das sementes em colheita tardia. As sementes apresentam manchas deprimidas, de coloração castanho-escuras, e nos estádios R3 e R4 adquirem coloração castanha escura à negra e ficam retorcidas (ALMEIDA et al., 2005). A doença caracteriza-se por apresentar, no estágio de plântula, a chamada infecção latente, na qual o patógeno infecta a planta, mas os sintomas da doença, só serão observados em estádios mais avançados do seu desenvolvimento. Klingelfuss e Yorinori (2001), estudando a infecção latente nas folhas e nas hastes de soja, observaram que *C. truncatum* e *Cercospora kikuchii* estavam presentes nos folíolos de soja, mesmo na ausência de sintomas no campo. A doença é favorecida por elevadas precipitações e altas temperaturas, principalmente nos estádios finais do ciclo da cultura (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007).

2.4 *Colletotrichum*

Colletotrichum é um grande gênero pertencente à Classe dos Ascomicetos (*Glomerellaceae*, *Sordariomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*), abrangendo muitas espécies que causam a antracnose em muitas culturas (BAILEY; JEGGER, 1992). Os fungos filamentosos possuem ampla distribuição geográfica, sendo que os maiores danos ocorrem em ambientes quentes e úmidos, ou seja, nas regiões tropicais e subtropicais (WALLER, 1992). O gênero foi recentemente eleito o oitavo mais importante grupo de fungos patogênicos de plantas no mundo (DEAN et al., 2012).

O foco do sistema de classificação é o estado anamórfico do gênero, uma vez que o teleomórfico é comum apenas em poucas espécies do gênero (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000). No início do século XX, centenas de espécies foram definidas com base nos hospedeiros dos quais eram isolados (BUIATE et al., 2009). Em meados dos anos 50, Arx (1957) descartou a maioria da pesquisa sistemática e consolidou mais de 750 espécies em apenas onze, baseando-se em características morfológicas do micélio, dos esporos e estruturas de frutificação em meio de cultura. Com a realização de estudos mais detalhados sobre morfologia, caracteres culturais, patogenicidade, além de outros, o número de espécies de *Colletotrichum* foi gradualmente aumentando. Sutton (1980) apresentou uma chave de 22 espécies com excelente sumário sobre suas características morfológicas e sinonímias. Posteriormente, Sutton (1992) baseando-se em estudos mais detalhados envolvendo morfologia, caracteres culturais e capacidade patogênica, elevou para cerca de 40 espécies aceitas. Algumas delas são mais específicas a determinados hospedeiros, citando-se como exemplo, *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara a leguminosas, principalmente a feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), *C. musae* (Berk. & Curt) von Arx a frutos de bananeira (*Musa* spp.), enquanto que outras, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* podem ocorrer em diferentes famílias de hospedeiros. Neste último caso, a identificação da espécie e/ou espécies, somente com base morfológica, torna-se um tanto difícil, devido à variabilidade na expressão dos caracteres adotados, exigindo, portanto, a aplicação conjunta de outros métodos que possibilitem uma diferenciação correta (MENEZES, 2006).

As primeiras aplicações de dados de sequência de DNA para distinguir espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Mills, Hodson e Brown (1992) e Sreenivasaprasad, Brown e Mills (1992), identificaram variação nas sequências da região ITS1 de rDNA entre seis espécies de *Colletotrichum*, bem

como a detecção de polimorfismos na mesma região entre as linhagens de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros. Latunde-Dada et al. (1999) estudaram uma combinação de morfologia de *Colletotrichum*, forma e dimensão de conídios e atributos de crescimento com a taxonomia molecular, com base nas sequências de nucleotídeos da D2 e ITS-2 regiões do rDNA. Nesse estudo, comparou o isolado LARS 860 obtido de lesão de antracnose no feijão-caupi com outros isolados com a espécie determinada. Como resultado, os autores observaram que o isolado é distinto da espécie *C. destructivum* e parece mais intimamente relacionado com isolados de *C. gloeosporioides*.

As primeiras análises filogenéticas multilocus de espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Talhinhos et al. (2002), estudando um complexo de *C. acutatum* e usando os genes *tub2*, *HIS4* e *mtSSU*, encontraram nos três locos níveis semelhantes de resolução filogenética. As análises multilocus se tornaram comuns graças ao custo de sequenciamento reduzido e são utilizadas sequências geradas a partir de locos, tais como, actina (ACT), calmodulina (CAL), sintetase de quitina I (CHS-1), DNA liase (APN2), manganês superóxido dismutase (SOD2), a grande subunidade de RNA polimerase II (RPB1) e o fator de alongamento da tradução 1- α (EF1 α) (CANNON et al., 2012). Em um trabalho realizado por Cannon et al. (2012) usando análises multilocus em 119 espécies de *Colletotrichum*, foram obtidos, por meio da análise filogenética, nove grandes clados, bem como uma série de pequenos grupos e espécies isoladas.

Alguns patógenos pertencentes a esse gênero são hemibiotróficos, ou seja, comportam-se como biotróficos no início da fase de infecção, passando a necrotróficos nas fases finais da colonização de tecido hospedeiro (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Após a penetração, forma-se uma vesícula e inicia o crescimento intracelular de hifas que se desenvolvem dentro das células hospedeiras, sendo que a membrana plasmática do hospedeiro

permanece intacta, sendo esta a fase biotrófica. A infecção em seguida, entra na fase necrotrófica, em que o fungo forma hifas morfológicamente distintas, sendo estas as hifas secundárias e hifas necrotróficas, que obtém nutrientes da célula hospedeira morta (PERFECT et al., 1999). No entanto, o gênero é altamente diversificado, com diferentes subgrupos dentro de um único complexo de espécies que possuem diferentes níveis de virulência. Os fungos hemibiotróficos colonizam e sua interação biotrófica inicial com as células hospedeiras é facilitada por pequenas proteínas secretadas pelo patógeno, denominadas efetoras (SHARMA et al., 2011). Em contrapartida, as plantas evoluem formando proteínas de resistência que reconhecem os efetores específicos secretados pelos patógenos (DODDS; RATHJEN, 2010; JONES; DANGL, 2006). Reconhecimento dos efetores por proteínas das plantas resulta na morte das células infectadas que restringem assim o crescimento do patógeno (GAN et al., 2013).

Genes expandidos nos genomas das espécies de *Colletotrichum* incluem sequências que codificam proteínas secretadas (SSPs), genes de síntese de metabólitos secundários, proteases, hidratos de carbono e enzimas degradantes. Muitos SSP e genes de síntese de metabólitos secundários foram regulados positivamente durante a fase inicial da colonização do hospedeiro, enquanto que a fase de necrotrófica de crescimento é caracterizada pela regulação de sequências que codificam enzimas de degradação (GAN et al., 2013). O controle da interação patógeno-hospedeiro é realizado por trocas de sinais químicos entre esses, que resultarão na ativação ou na repressão de determinados genes. A manutenção dessa relação necessita de um fino controle genético de ambos, principalmente do patógeno que suprime as respostas de defesa, ao mesmo tempo em que mantém a célula vegetal viável para suprir suas necessidades nutricionais (O'CONNEL et al., 2000).

2.4.1 Origem da variabilidade

Devido à alta variabilidade das espécies de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características, a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, inter e intraespecíficas, podem feitas por outros métodos não morfológicos, os quais ampliam o conjunto de caracteres usados para identificá-las, devendo prover uma forma de estimar a diversidade genética e entender melhor a estrutura da população, notadamente no nível de subespécie (MENEZES, 2006).

Além da diferenciação morfológica de espécies, a sensibilidade diferencial a fungicida também tem sido utilizada como ferramenta para caracterizar a variabilidade entre isolados de uma mesma espécie fúngica (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006). Outro critério que evidencia a variabilidade entre os indivíduos de uma população, é a observação de diferenças fisiológicas quanto à capacidade de utilização de diferentes substratos. Além de diferenças no crescimento micelial e esporulação em função do substrato usado para o cultivo, diferenças na agressividade ao hospedeiro já foram observadas. Esta característica de diferença na agressividade, citada por Lenn e Brown (1991), está intimamente relacionada ao estado nutricional do fungo e o estabelecimento das interações entre o patógeno e seu hospedeiro, afetando processos como germinação dos esporos e desenvolvimento do patógeno.

A variabilidade em fungos pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como mutação que atua criando a variabilidade, e os processos que ampliam a variabilidade, como o ciclo sexual, parassexualidade e anastomose entre hifas (MENEZES, 2006) e também tipo de célula especializada encontrada em

diferentes espécies de *Colletotrichum*, denominada tubos de anastomoses entre conídios (Conidial Anastomosis Tubes - CATs) (ROCA et al., 2003).

A formação de CATs entre conídios de *C. lindemuthianum* parece ser um processo tardio, uma vez que, estas estruturas só foram observadas após o final da esporulação. Os CATs parecem ser um fenômeno muito comum em fungos, mas informações sobre sua importância biológica eram escassas até poucos anos atrás (ROCA et al., 2005). Estes autores sugerem que os CATs podem ser importantes para incrementar as chances de estabelecimento da colônia e/ou para transferência de genes e suas funções precisam ser rigorosamente analisados, experimentalmente. Conídios unidos por CATs foram encontrados germinando mais rapidamente do que conídios individuais (ROCA et al., 2003). Esse fenômeno ocorre durante o ciclo assexual, dando a oportunidade para genótipos diferentes da espécie encontrar-se num complexo comum (complexo formado pelas anastomoses). Esse fato pode levar ao surgimento de fenótipos diferentes, com base em outros preexistentes (ROCA et al., 2004). Além disso, a porcentagem de formação de CATs é influenciada pelo meio de cultura utilizada para o crescimento da colônia, pela idade da cultura, sendo mais frequente em colônias mais velhas, e também varia de acordo com o isolado analisado (ISHIKAWA et al., 2010b). Em *C. lindemuthianum* o CATs têm sido estudado com detalhes. Ishikawa et al. (2010b), estabeleceu um protocolo para observação de CATs nesta espécie, e o máximo de fusão de conídios encontrada foi de 25,8%.

Ishikawa et al. (2012) realizaram análises *in vivo* utilizando fluorescentes vermelhas e verdes. Os autores observaram o comportamento nuclear durante a fusão de CATs. A incompatibilidade do heterocário foi observada entre as colônias de linhagens vegetativamente incompatíveis, resultando em morte celular. No entanto, a fusão de CATs entre conídios uninucleados destes isolados incompatíveis não causou a reação de

incompatibilidade. Os núcleos vermelhos e verdes da combinação destes isolados mostraram migrar de um conídio para outro, formando o heterocário e, posteriormente, ocorreu a mitose. A formação de núcleos amarelos resultantes desta combinação após a fusão foi observada em 27% dos heterocários formados. Neste mesmo trabalho, os autores confirmaram que a formação de heterocários como consequência da fusão de CATs pode gerar isolados com fenótipos distintos, provavelmente devido à geração de novos genótipos. A partir de testes de patogenicidade comprovou-se a ocorrência de raças diferentes das linhagens avaliadas, assim a fusão de CATs é um mecanismo potencial de recombinação não meiótica nesta espécie, gerando variabilidade por meio da transferência horizontal de genes.

Pinto et al. (2012), avaliando uma população de 74 isolados de *C. lindemuthianum*, observou ampla variabilidade na formação de CATs, uma vez que apenas quatro não apresentaram a formação e a maior porcentagem de fusão foi de 60%. Os resultados indicam que a fusão de tubos de anastomose entre conídios foi frequente nesta população, indicando que a recombinação assexual pode estar auxiliando na geração de variabilidade desta espécie.

O ciclo sexual de fungos caracteriza, de forma geral, pela existência de um mesmo citoplasma de núcleos haploides com constituições genéticas distintas (dicárions) que se fundem em estruturas apropriadas, produzindo um núcleo diplóide, que, quase imediatamente, sofre meiose, restaurando o estado haplóide dos núcleos (AZEVEDO, 1987). Souza, Camargo Junior e Pinto (2010), estudando a reprodução e a estrutura populacional de *Colletotrichum*, verificaram que, apesar de ser encontrado na forma sexual e de suas estruturas de reprodução sexuais não terem sido observadas na natureza, sua organização e diversidade genética são mais semelhantes à de populações originadas de reprodução sexuada do que populações assexuadas. Este é um indicativo de que,

realmente, ela pode estar ocorrendo no campo e explicaria a grande variabilidade genética apresentada pela espécie.

Anastomoses de hifas permitem a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferente sendo este evento requerido nas reações de compatibilidade, início da reprodução sexual, formação de heterocarions, ciclo parassexual e a distribuição de nutrientes no micélio/colônia (GLASS; JACOBSEN; SHIU, 2000). Heterocário é a presença de núcleos distintos no mesmo citoplasma e é conseguida em fungos filamentosos, por meio das anastomoses entre hifas. Segundo Azevedo (1998), para o início do processo parassexual é necessária a heterocariose. O fenômeno da heterocariose é um importante componente do ciclo de vida dos fungos anamórficos e serve para a transmissão de fatores de hipovirulência, tais como RNAs de fita dupla, diferindo assim os componentes de virulência ou gama de hospedeiros (LESLIE, 1993). Embora sejam óbvios os benefícios da formação do heterocário, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (GLASS; JACOBSEN; SHIU, 2000). Em fungos filamentosos existe o reconhecimento sexual que é controlado por locos *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, controlado pelo loco específico *het* (SAUPE, 2000). Quando dois indivíduos se encontram, eles podem sofrer a fusão celular ou anastomose. Se os dois indivíduos tiverem o mesmo genótipo *het* ou *vic*, ocorre a heterocariose. Se eles diferirem geneticamente para o loco, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (SAUPE, 2000).

Acredita-se que a incompatibilidade vegetativa funcione como um sistema de reconhecimento de genótipos diferentes para limitar a passagem de elementos infecciosos, prevenirem a exploração por núcleos mal adaptados e/o prevenir que recursos sejam retirados durante a reprodução sexual, sendo, portanto, um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (GLASS;

JACOBSEN; SHIU, 2000). Saupe (2000) comenta que a função dos genes *het* é preservar a individualidade genética e é uma importante ferramenta para a análise de populações em fungos (SAUPE, 2000). Barcelos, Souza e Silva (2011) utilizaram 47 isolados pertencentes a diferentes raças de *C. lindemuthianum* para análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). Neste trabalho, observou-se a formação de 45 grupos de compatibilidade vegetativa, em que 44 isolados foram incompatíveis e em apenas uma combinação foi observada a formação do heterocário. A alta incompatibilidade entre os isolados utilizados neste estudo pode ser explicada pela autoincompatibilidade, pois a formação de heterocários foi baixa, evidenciando a grande variabilidade existente nesta espécie.

No estudo de Pinto, 2012, foram usados quatro isolados da população sexual estes formaram três diferentes grupos de compatibilidade vegetativa. Os isolados UFLAG21-1 e UFLAG46-1 foram compatíveis e, portanto, pertence a um mesmo VCG, o que indica que estas linhagens possuem os mesmos genótipos para os genes que controlam a compatibilidade vegetativa. Entretanto, os resultados da análise por meio de marcadores RAPD não evidenciaram nenhuma associação com a compatibilidade vegetativa, indicando que o genótipo semelhante para esse caráter não tem reflexo significativo na similaridade genética entre os isolados. Ainda assim, os mutantes Nit provenientes dos isolados UFLAG21-1, UFLAG46-1 e UFLAG112-1 poderão ser muito úteis em análises genéticas, se mantiverem a compatibilidade sexual, exibida neste estudo, por seus parentais selvagens.

2.4.2 *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo é hemibiotrófico intracelular e se reproduz assexuadamente. Os conídios são produzidos num corpo de frutificação denominado acérvulo e

formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e oblongos ou cilíndricos e germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o caule (KIMATI, 1997).

O patógeno apresenta grande variabilidade morfológica, fisiológica e citológica. *C. lindemuthianum* apresenta micélio septado e ramificado com coloração variando de hialina à negra. Os conídios formam massa de cor salmão no meio de cultura, variando de 14,46-18,98 x 4,09-6,19 µm. Os conídios podem ou não produzir septo após a germinação, podendo emitir um ou mais tubos germinativos, que podem formar apressórios ou então continuar crescendo formando as hifas e micélio (PINTO et al., 2012). Os apressórios são marrom-escuros, clavados ou ovalados com dimensões de 8 x 6-7 µm (SUTTON, 1992).

C. lindemuthianum possui ampla diversidade de virulência, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética (PEREIRA et al., 2010). Esta alta variabilidade torna essencial o monitoramento constante deste patógeno para auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes de feijão, como principal alternativa no controle da doença (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994).

Atualmente, mais de cem raças de *C. lindemuthianum* já foram identificadas em todo o mundo, mostrando uma grande variabilidade neste patógeno (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). O método de identificação das cultivares foi proposto pelo CIAT (Cali, Colômbia), determinando à padronização de doze cultivares diferenciadoras e o uso do sistema binário proposto por Habgood (1970). Este método de identificação de raças fisiológicas consiste na utilização de um grupo de cultivares diferenciadoras internacionais, dispostas em uma ordem pré-estabelecida, utilizando um método binário e obtidas por expansão binomial de tal forma que o nome da raça é o número. Este sistema permite identificar um total de $2^n = 2^{12} = 4096$ raças, em que n é o número

de cultivares diferenciadoras (1 a 12), com seus respectivos valores binários. É possível observar por meio do levantamento realizado por Mahuku e Riascos (2004) com 200 isolados amostrados em vários países no mundo, que as cultivares diferenciadoras já tiveram a sua resistência quebrada por isolados de *C. lindemuthianum*. Além disso, tem sido detectada variabilidade patogênica dentro das raças. Ishikawa, Ramalho e Souza (2011) propôs um conjunto de diferenciadoras capaz de identificar variações dentro da raça 65. Para o estudo foi utilizado um total de 12 linhagens de feijoeiro adaptadas às condições brasileiras e 12 isolados classificados como raça 65. Para a identificação da variabilidade, foram sugeridas as seguintes linhagens de feijoeiro comum e seus respectivos números binários: Estilo (2^0), Majestoso (2^1), Supremo (2^2), União (2^3), Valente (2^4), Ouro Vermelho (2^5), Madrepérola (2^6) e Talismã (2^7). Todas essas cultivares são bem adaptadas para as condições brasileiras e são comercialmente disponíveis, o que facilita a sua utilização.

Na fase teleomorfa, o fungo é conhecido como *Glomerella cingulata* Stonem Spauld & V. Schrenk f.sp. *phaseoli* (KIMATI; GALLI, 1970). O fungo produz um corpo de frutificação denominado peritécio, com diâmetro que varia de 85 a 300 μm . A parede do peritécio é hialina e, à medida que envelhece, torna-se enegrecida a partir do ápice. O canal do peritécio é forrado por paráfises (filamentos estéreis dos corpos de frutificação), e os rostros, quando presentes, medem de 30 a 80 μm . Dentro dos peritécios estão os ascos em formato de bastão ou cilíndricos, com parede fina contendo de 1 a 8 ascósporos arranjados aleatoriamente. Os ascos aparecem em número médio de 30 por peritécio, medem 60 x 8 μm , e são envolvidos por paráfises filiformes e delicadas até o 27º dia do seu desenvolvimento. Os mesmos podem ser alantóides (20 x 6,5 μm) e elipsoidais (10 x 4 μm) (BAILEY; JEGGER, 1992).

Uma grande variabilidade para características de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* já foram descritas. Uma delas é o tamanho de ascósporos e conídios.

Para os ascósporos, variando no comprimento de 18,26- 38,85 μm e para largura variando de 4,94- 10,4 μm (ROCA et al., 2003; SOUZA, 2005). Os conídios variam no comprimento de 13-22 μm e a largura varia de 2,86-4,75 μm (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; PINTO, 2012; RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; ROCA et al., 2003).

No entanto, há evidência que *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* relatadas nos recentes estudos de Barcelos (2010), Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011) e Pinto (2012) provavelmente não é a fase sexual do *C. lindemuthianum*, e portanto é uma nova espécie, que co-habita lesões de antracnose no feijoeiro, uma vez que a partir das lesões são isoladas ambas as formas do patógeno. Em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, os resultados até agora obtidos no teste de patogenicidade, não foram patogênicos nas 12 cultivares diferenciadoras do feijoeiro (BARCELOS, 2010; CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2010b; MOTA, 2011). No entanto, no estudo realizado por Barcelos (2010) observou ascósporos germinados e com a formação de apressório na superfície da folha, porém não foi observada a ocorrência de infecção na planta.

2.4.3 *Colletotrichum truncatum*

O fungo possui uma ampla variabilidade intraespecífica e também possui ampla família de hospedeiros, como soja, amendoim, luzerna, pimenta malagueta, pimentão, dentre outros. As hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Os conídios são hialinos, as paredes lisas para verruculosas, asseptados, com conteúdo granular, ligeiramente curvado com extremidades afiladas, e o tamanho variando de 20-23,5 x 3-4,5 μm . Os apressórios podem ser solitários, em grupos ou formar aglomerados densos, os bordos são arredondados ou elipsoidal clavado, de tamanho 6,5-13 x 5,5-7,5 μm (DAMM et al., 2009). Imediatamente antes ou durante o aparecimento do tubo germinativo,

pode desenvolver um septo no meio do conídio, dividindo-o em duas células uninucleadas (DYKE; MIMS, 1991).

As colônias são planas, com margem inteira, sem micélio aéreo coberto com acérvulos. Isolados de hospedeiros diferentes, muitas vezes exibem diferentes comportamentos nos diferentes hospedeiros. Por exemplo, os isolados de soja infectam culturas de muitas espécies de plantas daninhas (SINCLAIR et al., 1988), enquanto que isolados de cânhamo sesbânia (*Sesbania exaltata*) são específicos (BOYETTE, 1991). Isolados de lentilha são patogênicos em feijão fava, ervilha e grão de bico (*Cicer arietinum*) (ANDERSON, 2003).

Na fase teleomorfa, o fungo é conhecido como *Glomerella truncata* C.L. Armstrong-Cho & S. Banniza. Em lentilha, os peritécios se formam após sete dias de incubação, com coloração marrom-escura a negra. Os peritécios são superficiais, solitários ou em pequenos grupos, variando o tamanho 200-520 x 110-320 µm. Os ascos são cilíndricos estreitando um pouco no ápice, com oito ascósporos dispostos linearmente. Os ascos maduros são observados após 10-14 dias de incubação e seu tamanho varia de 53-142 x 5-14 µm. Os ascósporos são hialinos, asseptados, oblongo e o tamanho varia de 12-20 x 5-8 µm (DAMM et al., 2009). As colônias resultantes de um único ascósporo possuem a mesma morfologia de cultura e de conídios. As colônias são salmão-laranja, com cerdas esparsas e escleródios (SUTTON, 1992). Conídios e ascósporos presentes na mesma colônia são indistinguíveis, os conídios são ligeiramente falcados, variando de 18-24 x 4-6 µm, o que corresponde à descrição de conídios de *C. truncatum* por Sutton (1980).

No entanto, em feijão, pouco se sabe sobre o patógeno. Apenas um trabalho foi publicado pela Embrapa. Nesse trabalho, os conídios foram classificados como hialinos, falciformes, não septados e com dimensões variando de 13,5-27,0 x 2,7-5,4µm. Os apressórios obtidos em meio de cultura

apresentam-se esféricos, piriformes e de forma irregular, medindo 16,2-54,0 x 13,5-40,8µm (COSTA et al., 2001).

2.5 Marcadores IRAP/REMAP

Elementos transponíveis ou DNA saltitantes são sequências de DNA que se movem de um local para outro do genoma e frequentemente duplicam-se neste processo (WESSLER, 2006). Os elementos transponíveis podem ser classificados em ordem hierárquica em classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Existem duas classes de elementos que se diferenciam na presença ou ausência de um RNA intermediário no processo de transposição. Na classe I, a partir de uma cópia de RNA do transposon ocorre, via transcriptase reversa, a síntese de DNA que então é capaz de se inserir em um sítio alvo. Nos elementos da classe II, ocorre diretamente um processo de excisão seguido de integração. A classe II é dividida em duas subclasses. A subclasse 1 é composta por elementos que não se duplicam antes da inserção e se transpõem por mecanismos de excisão e integração com ambas as fitas do DNA clivadas durante o processo de excisão. Na subclasse 2 ocorre a duplicação do elemento antes da inserção com a clivagem de apenas uma das fitas de DNA. A classificação em ordem é baseada nas diferenças de organização do elemento transponível e também em sua enzimologia. As superfamílias que pertencerem à mesma ordem compartilham uma estratégia de replicação em comum, mas podem se diferenciar quanto à estrutura das proteínas, regiões não codificantes e presença e tamanho da duplicação do sítio alvo. As famílias de elementos transponíveis são definidas de acordo com a identidade na sequência de DNA dos elementos transponíveis que a compõem. As famílias podem ainda serem divididas em subfamílias definidas com base em dados filogenéticos (WICKER et al., 2007).

Todos os elementos transponíveis da Classe I transpõem via um RNA intermediário, que é transcrito de uma cópia do genoma e um cDNA é sintetizado via transcriptase reversa codificada pelo próprio elemento. Cada ciclo completo de transposição produz uma nova cópia. Consequentemente, retrotransposons são frequentemente os principais colaboradores para uma fração repetitiva do genoma. Os retrotransposons podem ser divididos em cinco ordens com base no mecanismo de transposição, organização e filogenia da transcriptase reversa: retrotransposon LTR, DIRS-like, Penélope-like, LINEs e SINEs (WICKER et al., 2007).

Os elementos transponíveis, distribuem de forma desigual em todo o genoma, e a tendência é aglomerar em torno do centrômero e do telômero. Os mais abundantes em plantas são os retrotransposons LTR, responsáveis por 40-70% do DNA total (PEARCE et al., 1996; SANMIGUEL et al., 1996; SHIRASU et al., 2000). Os LTRs são retrotransposons autônomos e que utilizam RNA como intermediário no mecanismo de transposição. As regiões LTR codificam as proteínas para própria replicação e integração no genoma (SABOT; SCHULMAN, 2006). Uma cópia quase completa de RNA entre dois LTRs, um de partida e outro de poliadenilação, o RNA é reversamente transcrito em cDNA extracromossômico e depois integrado no genoma do hospedeiro (FRANKEL; YOUNG, 1998; KIM et al., 2004; WICKER et al., 2007). Pode inserir várias cópias, mas as antigas permanecem (KALENDAR; SCHULMAN, 2006). Os retrotransposons são usados como marcadores, pois possuem DNA repetitivo, as regiões LTR possuem sequências altamente conservadas, por meio da transcriptase reversa são formadas longas sequências gerando polimorfismo (KALENDAR et al., 1999).

Os marcadores IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) e REMAP (Retrotransposon- Microsatellite Amplified Polymorphism) são exemplos de marcadores baseados em retrotransposons. O primeiro entre dois

retrotransposons e o segundo entre retrotransposon e um microssatélite (KALENDAR, 2011). A complexidade obtida no IRAP será influenciada pelo número de cópias, padrão de inserção e da família de retrotransposons escolhida (KALENDAR et al., 1999).

Os marcadores IRAP/ REMAP são usados, pois ocorrem em alta abundância no genoma, possuem alta reprodutibilidade, especificidade dos locos, usam baixa quantidade de DNA, no entanto possuem nível médio de polimorfismo (KALENDAR; SCHULMAN, 2006). A técnica surgiu em 1999 com Kalendar et al. (1999) por meio da família de retrotransposon BARE-1, delimitado por longas repetições terminais (LTRs), que são altamente conservadas e presente na cevada.

Os retrotransposons comportam-se como locos mendelianos, assim são marcadores co-dominantes, no entanto em fungos que são haploides, se comportam como marcadores dominantes (KALENDAR, 2011). Geralmente a técnica REMAP é capaz de distinguir melhor os indivíduos mais proximamente relacionados do que o IRAP por levar em consideração o desenho de oligonucleotídeos para regiões de microssatélites que são conhecidas por estarem presentes em grande número no genoma. Assim, o número de bandas detectadas por REMAP reflete melhor o número de LTRs examinadas no genoma. Uma das grandes vantagens de se utilizar marcadores com base em IRAP e REMAP pode ser a alta capacidade de rastrear eventos de inserção e sua subsequente verticalização por meio de um pedigree ou filogenia (KALENDAR et al., 1999).

Em fungos, REMAP foi descrito primeiramente em *Magnaporthe grisea* para um estudo de diversidade genética usando 15 isolados e foi um método eficiente, obtendo um polimorfismo de 82% (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2005). As técnicas também foram usadas para o fungo *Tricholoma Matsutke* para identificar origem geográfica (MURATA et al., 2008) e em *Moniliophthora*

perniciosa para estudos de variabilidade genética de diferentes origens geográfica e biótipos (SANTANA et al., 2013).

Santos et al. (2012) utilizaram 54 isolados de *C. lindemuthianum* pertencentes a 24 raças diferentes para análise intraespecífica da estrutura da população. Com base na combinação de eletroforese de IRAP e REMAP, 62% dos locos observados foram polimórficos. Um total de 45 locos foi amplificado e entre eles 26 locos foram amplificados por IRAP e 19 amplificados por REMAP, mostrando que isolados com perfis idênticos de virulência foram incluídos em diferentes grupos ou subgrupos. Um total de nove isolados pertencentes a seis espécies diferentes foi usado para testes interespecíficos. Entre os isolados utilizados, apenas a espécie *C. capsici* obteve padrões de amplificação monomórficos e os isolados restantes tiveram padrões polimórficos entre espécies e dentro da mesma espécie, quando foram isolados a partir de diferentes hospedeiros. Diferentes espécies isoladas do mesmo hospedeiro (pimentão) obtiveram diferentes padrões eletroforéticos, portanto, foi possível visualizar amplicons únicos em certas espécies. Os resultados são reprodutíveis e estão presentes em diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*, o que permite estudos intra e interespecífica.

Já Santana et al. (2013) obtiveram os *primers* CIIRAP utilizando o elemento transponível RetroCl1 sequência de *Colletotrichum lindemuthianum* para ser usado como marcador molecular IRAP. Os perfis foram gerados para 27 espécies diferentes de fungos de 11 ordens diferentes, sendo detectada a variabilidade genética entre seis espécies, indicando que esse marcador pode ser usado para espécies de fungos sem o conhecimento prévio do genoma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento e condições de cultivo

Vinte e dois isolados de *Colletotrichum* foram obtidos a partir de vagens, folhas e pecíolos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) naturalmente infectados. As coletas foram realizadas no ano de 2009 e 2013 em Minas Gerais, Brasil. Pequenos pedaços de tecidos infectados foram esterilizados e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura M3 (JUNQUEIRA et al., 1984). A partir dos isolamentos foram obtidas 16 culturas monoascospóricas e seis culturas monospóricas que foram mantidas em meio de cultura M3 a 22 °C no escuro (Tabela 1).

Tabela 1 Código dos 22 isolados, raça, Cultura, doença proveniente e local de origem dos 22 isolados analisados

Nº	Isolados	Raça	Cultura	Lesão do feijoeiro	Local
1	LV134	65	Monospórica/conidial	Antracnose	Lambari
2	LV145	65	Monospórica/conidial	Antracnose	Lambari
3	LV153	81	Monospórica/conidial	Antracnose	Lambari
4	LV175	65	Monospórica/conidial	Antracnose	Lavras
5	LV228	89	Monospórica/conidial	Antracnose	Lavras
6	LV238	65	Monospórica/conidial	Antracnose	Lavras
7	G7-2	0	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
8	G8-1	0	Monoascospórica/peritecial	Antracnose	Lavras
9	G15-5	0	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lambari
10	G25-1	0	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lambari
11	G43-2	0	Monoascospórica/peritecial	Antracnose	Lambari
12	G68-1	0	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
13	G85-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
14	G86-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
15	G89-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras

“Tabela 1, conclusão”

Nº	Isolados	Raça	Cultura	Lesão do feijoeiro	Local
16	G92-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
17	G93-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
18	G99-1	-	Monoascospórica/conidial	Antracnose	Lavras
19	S1	-	Monoascospórica/conidial	Sarna	Lambari
20	S2	-	Monoascospórica/conidial	Sarna	Lambari
21	S5	-	Monoascospórica/conidial	Sarna	Lambari
22	S6	-	Monoascospórica/conidial	Sarna	Lambari

3.2 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial

Para avaliação do IVCM e do diâmetro colonial foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. A parcela foi constituída por uma placa de Petri. Discos de micélio de 6 mm de diâmetro provenientes de segunda repicagem foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio M3 e incubadas no escuro a 22 °C . O IVCM foi avaliado por meio da leitura das médias em centímetros entre os dois diâmetros ortogonais da colônia em intervalos de 24 horas durante 15 dias e estimado utilizando a expressão apresentada por Oliveira (1991). O diâmetro colonial foi determinado medindo-se os diâmetros ortogonais das colônias em centímetros após 15 dias de incubação.

3.3 Capacidade de esporulação

Para a avaliação da capacidade de esporulação o experimento em DIC foi conduzido com duas repetições. Placas de petri com meio BDA foram

inoculadas com os 22 isolados de *Colletotrichum* e incubadas a 22 °C por um período de 14, 15 e 16 dias no escuro. Cada parcela foi constituída por uma placa. Foram obtidas suspensões de conídios embebendo-se as placas inoculadas em 7 mL de água estéril e filtrando-se a suspensão com Miracloth. Uma alíquota (10 µL) foi retirada de cada suspensão original e realizou-se a leitura da concentração de conídios segundo metodologia descrita por Dias (2002).

3.4 Caracterização dos conídios, porcentagem de germinação e anastomose entre conídios

Suspensões de conídios na concentração de $1,2 \times 10^6$ foram obtidas como descrito anteriormente, a partir de placas contendo BDA com 15 dias de incubação. 200 µL das suspensões de conídios foram gotejados em uma célula em lâmina de cultivo de oito células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubadas a 22 °C no escuro por 24 horas. Amostras foram examinadas após adicionar o corante Calcofluor White na concentração de 0.12 M por 3-4 minutos em temperatura ambiente usando um microscópio de epifluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1). A fluorescência foi detectada a 420/70 nm usando a objetiva de 40x. Imagens do microscópio de epifluorescência foram capturadas usando o software Axiovision Zeiss e processadas usando o software Image J. Foi usada também uma segunda metodologia, escrita por Damm, Crous e Fourie (2007), utilizando a microscopia de interferência de contraste invertido (Zeiss Axio Observer Z1).

Para as medições citológicas foram analisados 30 conídios não germinados de cada isolado em DIC. A largura e comprimento dos conídios (µm) foram obtidos usando o software Image Tool 3.0. Os conídios germinados de cada isolado foram classificados com presença ou ausência de septo. Na avaliação da porcentagem de germinação de conídios um experimento em DIC

foi conduzido em esquema de parcela subdividida no tempo com duas repetições. Foram utilizadas suspensões de conídios ajustadas para $1,2 \times 10^6$ conídios/mL para cada isolado. Uma alíquota de 200 μ L foi colocada em câmaras de cultivo conforme descrito anteriormente. Após 24 e 48 horas a 22 °C no escuro foram avaliados 100 conídios por repetição por meio de microscopia de luz. Os conídios que apresentaram tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que o menor diâmetro do conídio foi considerado germinado. A formação de CATs foi quantificada como a porcentagem de conídios envolvidos em fusões (ISHIKAWA et al., 2010b). Para esta análise foram realizadas duas repetições, sendo avaliados 100 conídios por repetição.

3.5 Teste de patogenicidade

Para a avaliação patogênica, foram utilizados 10 isolados, quatro obtidos a partir de lesões de sarna do feijoeiro (S1, S2, S5 e S6) e seis isolados de lesões da antracnose do feijoeiro (G85-1, G86-1, G89-1, G92-1, G93-1, G99-1). O teste de patogenicidade foi realizado a partir da inoculação dos dez isolados em três cultivares de feijão (Majestoso, Pérola e Talismã) e três cultivares de soja (CD202, CD237 e Favorita). Os isolados foram crescidos em placas de Petri com BDA por 15 dias a 22 °C. A suspensão de esporos foi obtida por meio da raspagem das placas com água destilada estéril e filtradas com Miracloth e ajustadas à concentração de $1,2 \times 10^6$ esporos/mL. Foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com seis tratamentos (cultivares) com duas repetições para cada isolado. Cada parcela foi constituída por nove plantas. As seis cultivares foram semeadas em bandejas contendo substrato Multiplanta. As plântulas foram inoculadas de acordo com a metodologia descrita por Pinto et al. (2012). A severidade da doença foi avaliada aos 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação por meio da escala de notas proposta

por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987). A escala varia de 1 a 9, a nota 1 ausência de sintomas; a nota 2 até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; nota 3 maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; a nota 4 até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; a nota 5 maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; a nota 6 manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos; a nota 7 manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos; a nota 8 manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas e a nota 9 a maioria das plantas mortas.

3.6 Compatibilidade sexual e micelial

Foram confrontados todos os isolados dois a dois, em placas de petri contendo M3 e os discos miceliais de 6 mm de diâmetro foram dispostos a uma distância de 2 cm um do outro. A avaliação foi realizada após 15 dias de incubação a 22 °C no escuro. A formação de uma linha de contato negra com presença de peritécios entre os isolados confrontados indicou a ocorrência de compatibilidade sexual. A compatibilidade micelial foi determinada quando o par de isolados apresentou micélios misturados uniformemente.

3.7 A Extração DNA

Para a obtenção da massa micelial, pequenos discos de meio de cultura contendo micélio do fungo foram transferidos para erlenmeyers contendo aproximadamente 150 mL de meio de cultura líquido M3. Os frascos foram mantidos, a 22 °C, em incubadora com agitação constante de 110 rpm/min, por cerca de 3 a 4 dias, no escuro. O micélio teve sua umidade reduzida com o uso de bomba a vácuo e, posteriormente, foi liofilizado.

O DNA foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada com a metodologia de Kaufman, Richards e Dierig (1999). As alíquotas de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1% e diluídas para a concentração de 20 ng/μL, para serem utilizadas como solução de trabalho.

3.8 Análises de PCR genes Mating-type

Nas reações de PCR foi utilizado um par de *primers* específico para *C. lindemuthianum*, descrito na literatura por García-Serrano et al. (2008), que amplifica a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*, sendo eles HMGCLF e HMGCLR. Em razão de os isolados pertencentes à população da fase sexual não amplificarem bandas quando testados com os *primers* específicos para *C. lindemuthianum* citados anteriormente, um par de *primers* específicos para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, HMGGLOF e HMGGLOR, desenvolvido por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), também foi utilizado na caracterização dessa população. Assim como os *primers* descritos por García-Serrano et al. (2008), os *primers* específicos para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* amplificam a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*. Como alguns

isolados são provenientes de lesões da sarna do feijoeiro, mas de origem ascospórica, os isolados foram testados com *primers* específicos para *Glomerella truncata*, CT21HMGF e CT21HMGR, desenvolvidos por Menat et al. (2012). Todos os géis foram tratados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta (Fotodyne Ultraviolet Trans-illuminator) e fotografados com câmera digital Kodak EDA-290.

3.9 Marcador IRAP

Para a técnica, os iniciadores foram concebidos utilizando regiões conservadas TDR (Sequências repetidas terminais diretas) do RetroCl (Retroelemento *Colletotrichum lindemuthianum* 1) retrotransposons, apresentando características da família dos retrotransposons repetidos terminais em miniatura, TRIM e segundo a metodologia de Santana et al. (2013).

Os pares de oligonucleotídeos (Tabela 2) utilizados foram:

- IRAP: IRAP2/IRAP4 e IRAP1/IRAP4

Tabela 2 Oligonucleotídeos utilizados nas análises de IRAP

Oligonucleotídeo	Sequência
CIIRAP2	5'AATAACGTCTCGGCCTTCAG3'
CIIRAP4	51CTTTTGACGAGGCCATGC3'
CIIRAP1	5'CGTACGGAACACGCTACAGA3'

Fonte: (Santana et al.,2013).

3.10 Análises Estatísticas

Na análise do IRAP, os diferentes padrões de amplicons entre os isolados foram avaliadas visualmente. As bandas para cada combinação respectiva de iniciadores utilizados na amplificação seletiva foram identificadas com o número um (presença) e zero (ausência). A reprodutibilidade do perfil de bandas do DNA foi testada por repetição da PCR com cada um dos primers selecionados. Somente bandas com reprodutibilidade foram consideradas para a análise. As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}) entre os isolados foram efetuadas pelo coeficiente de Dice (1945) usando o programa NTSYS – pc 2.1 (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade foi empregada para construir o dendograma e a análise de agrupamento foi realizada pelo método da média das similaridades (UPGMA) (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000). Os erros associados a cada estimativa de similaridade foram estimados utilizando-se a expressão $s_{sg} = [sg_{ij} (1 - sg_{ij}) / (n-1)]^{0.5}$, em que n é a soma de a , b e c para cada par de isolados. Os isolados pertencentes a diferentes grupos foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade (sgm). O sgm foi estimado por meio do teste de t , utilizando-se a expressão $sgm = 1 - (t \times sgs)$, em que t é o valor tabelado da distribuição de t de Student, a 1% de probabilidade, com $n-2$ graus de liberdade e o sgs é o erro médio das comparações consideradas.

Para o experimento de compatibilidade, foi construída uma matriz de 0 e 1 com os dados de compatibilidade, considerando 0 para as reações de incompatibilidade e 1 para as reações compatíveis. Para estimativa da similaridade, foi utilizado o coeficiente de Russel e Rao (1940) por meio da expressão $sg_{ij} = a / a + b + c + d$, sendo a compatibilidade para ambos os isolados i e j , b compatível apenas para o isolado i , c apenas no isolado j e d incompatível para ambos isolados i e j . O dendograma foi obtido também pelo

método UPGMA e os isolados pertencentes a diferentes grupos de anastomoses foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade (sgm).

Foram realizadas as Análises de Variância para IVCM, diâmetro colonial, dimensão dos esporos e anastomose. Para a germinação foi realizada uma análise de variância com parcela subdividida no tempo. Para a taxa de esporulação e análise patogênica foi realizada a análise de variância para cada dia e posteriormente uma análise conjunta. Para todas as características foram realizadas comparações entre as médias utilizando o teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Todas as análises de variâncias, testes de médias e matrizes foram realizadas utilizando o Software estatístico R.

4 RESULTADOS

Para as avaliações e testes estatísticos, os isolados foram separados em dois grupos, sendo o primeiro denominado de Grupo *C. lindemuthianum* contendo todos os isolados com a inicial LV(LV134, LV145, LV153, LV175, LV228, LV238) e o segundo, Grupo *Colletotrichum* spp. contendo os demais (G85-1, G86-1, G89-1, G92-1, G93-1, G99-1, S1, S2, S5, S6, G7-2, G8-1, G15-5, G25-1, G43-2, G68-1). Essa separação foi necessária para atender os pressupostos da Análise de Variância.

4.1 Morfologia da Colônia

Os isolados apresentaram alta variabilidade quanto à coloração das colônias. Nos estágios iniciais, os isolados do Grupo *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões de antracnose apresentaram coloração de branca a cinza. Aos 15 dias, a cor das colônias tornou-se cinza a negra, sendo observada apenas a formação de conídios, portanto, essas colônias foram classificadas como conidiais. As colônias que produziram conídios apresentaram uma coloração alaranjada ou rosa na superfície, exceto os isolados G8-1 e G43-2. Estes dois isolados nos estágios iniciais apresentaram coloração branca, e a partir de 15 dias, mantiveram a coloração, porém ocorreu a formação do ciclo sexual completo, formando peritécios, do tipo aglomerado “plus” (EDGERTON, 1914) com ascósporos e conídios. Os isolados do Grupo *C. lindemuthianum*, desde o início do crescimento, apresentaram coloração cinza a negra, e tornaram-se totalmente negros aos 15 dias. Já os isolados oriundos de lesões de sarna apresentaram no início coloração branca e aos 15 dias mantiveram a coloração, no entanto, apareceram pontuações negras, isto é, pseudoperitécios. Essas

colônias produziram conídios e apresentaram uma coloração alaranjada na superfície.

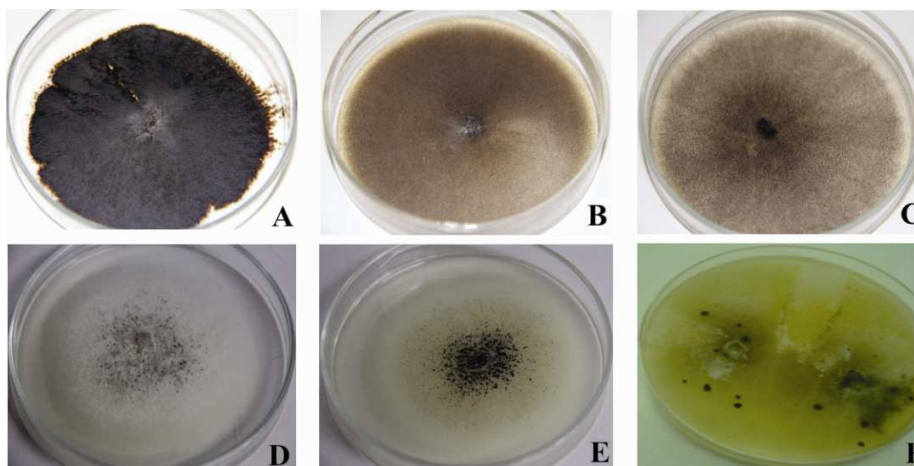


Figura 1 Placas dos isolados de *Colletotrichum*

Nota: A. Isolado LV228. B. Isolado G86-1. C. Isolado G93-1. D. Isolado S5. E. Isolado S1. F. Isolado G8-1.

4.2 Índice de velocidade de crescimento Micelial (IVCM) e Diâmetro Colonial

Na análise do diâmetro colonial e IVCM, os isolados de *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum* spp. foram avaliados separadamente. Os isolados do primeiro grupo foram avaliados por 15 dias, no entanto, os isolados do segundo grupo foram avaliados por oito dias, uma vez que a maioria dos isolados do grupo já havia atingido o tamanho total das placas. Os isolados de *C. lindemuthianum* formaram dois grupos distintos para o IVCM e para o diâmetro colonial, enquanto os isolados de *Colletotrichum* spp. formaram cinco grupos para diâmetro colonial e dois grupos para o IVCM. Para ambos os testes, a variabilidade foi alta, tendo o crescimento médio variado de 2,56 mm/dia

(LV228) a 3,92 mm/dia (LV238) para os isolados de *C. lindemuthianum* e de 8,89 mm/dia (G85-1) a 10,07 mm/dia (G25-1) para os de *Colletotrichum* spp. Já para o diâmetro colonial, os valores foram de 24,50 mm (LV153) a 36,25 mm (LV238) e 71 mm (S2) a 80 mm (G86-1, G89-1, G93-1, G99-1, G7-2, G8-1, G15-5 e G25-1) para *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum* spp, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 Estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para o diâmetro colonial (mm), IVCm (mm/dia), e taxa de esporulação aos 14, 15 e 16 dias de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro

Isolado	DC*	IVCM*	Taxa de esporulação*		
			14 dias	15 dias	16 dias
Isolados <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>					
LV134	28,50± 3,11B	3,29± 0,28A	0,125± 0,035A	0,275± 0,035B	0,2250± 0,035B
LV145	26,25± 4,65B	3,37± 0,74A	0,225± 0,035A	0,150± 0,000B	0,2750± 0,035B
LV153	24,50± 1,00B	3,02± 0,28B	0,188± 0,017A	0,575± 0,212A	0,8250± 0,283A
LV175	26,50± 6,61B	2,87± 0,53B	0,138± 0,083A	0,175± 0,035B	0,2375± 0,123B
LV228	27,00± 8,04B	2,56± 0,57B	0,175± 0,106A	0,238± 0,053B	0,2875± 0,053B
LV238	36,25± 2,63A	3,92± 0,20A	0,088± 0,017A	0,238± 0,053B	0,1375± 0,018B
Isolados <i>Colletotrichum spp.</i>					
G7-2	80,00± 0,00A	9,75± 0,47A	5,01± 0,85B	4,14± 0,16B	2,04± 0,09D
G8-1	80,00± 0,00A	9,89± 0,14A	0,72± 0,00D	0,12± 0,04D	0,07± 0,04G
G15-5	80,00± 0,00A	10,07± 0,38A	0,62± 0,18C	0,66± 0,09C	1,14± 1,26E
G25-1	80,00± 0,00A	9,79± 0,44A	0,29± 0,12C	0,92± 0,07C	0,36± 0,05E

“Tabela 3, conclusão”

Isolado	DC*	IVCM*	Taxa de esporulação*		
			14 dias	15 dias	16 dias
Isolados <i>Colletotrichum spp.</i>					
G43-2	79,75± 0,50A	9,75± 0,39A	0,10± 0,03D	0,14± 0,05D	0,05± 0,00G
G68-1	79,75± 0,50A	9,43± 0,35B	4,99± 0,97B	15,29± 3,09A	11,66± 2,95B
G85-1	76,00± 2,16B	8,89± 0,32B	11,18± 8.94B	26,23± 16,79A	19,82± 4,28B
G86-1	80,00± 0,00A	9,68± 0,14A	9,67± 2,43B	15,75± 0,35A	50,00± 15,56 ^a
G89-1	80,00± 0,00A	9,64± 0,18A	7,43±2,93 B	11,58± 2,02A	22,80± 7,49B
G92-1	79,75± 0,50A	9,64± 0,18A	30,50± 6,36A	14,15± 11,10A	18,62± 8,66B
G93-1	80,00± 0,00A	9,93± 0,34A	0,67± 0,18C	1,00± 0,42C	1,92± 0,60D
G99-1	80,00± 0,00A	9,79± 0,27A	1,02± 0,04C	3,75± 1,06B	5,53± 0,88C
S1	74,25± 0,96C	9,30± 0,96B	0,54± 0,44C	1,27± 0,78B	0,20± 0,14F
S2	71,00± 0,82E	9,19± 0,82B	7,25± 3,39 B	15,50± 2,12A	16,50± 0,71B
S5	72,00± 2,00E	9,17± 2,99B	2,55± 0,85B	3,58± 0,39B	2,72± 0,88D
S6	73,00± 0,82D	9,06± 0,82B	7,85± 0,85B	7,22± 2,51B	7,08± 0,11C

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente (P<0,05), de acordo com o teste de Scott-Knott.

4.3 Caracterização dos conídios

Todos os conídios apresentaram formato cilíndrico, com exceção do isolado S1, que apresentou formato falciforme, formato também dos ascósporos avaliados (Figura 2) (Tabela 3).

Diferenças significativas (P<0.05) foram observadas para a largura e o comprimento dos conídios. A largura para os isolados de *C. lindemuthianum* variou de 3,78 µm (LV134) a 6,09 µm (LV238), formando dois grupos de

isolados distintos estatisticamente. Já na avaliação do comprimento dos conídios para os mesmos isolados foram observados três grupos distintos, sendo que as médias variaram de 12,58 μm (LV228) a 17,47 μm (LV145). Para os isolados de *Colletotrichum* spp., foram observados sete grupos distintos estatisticamente para largura e as médias variaram de 2,93 μm (G15-5) a 9,3 (G8-1). Já para o comprimento, os isolados foram classificados em oito grupos distintos e variaram de 9,05 μm (G15-5) e 28,94 μm (G8-1) (Tabela 4).

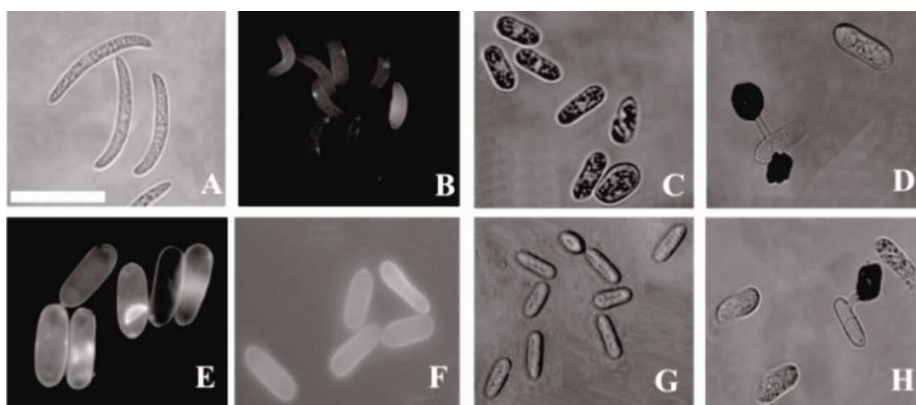


Figura 2 Formato dos conídios e ascósporos

Nota: A. Isolado S1. B. Isolado G43-2. C. Isolado S2. D. Isolado S5. E. Isolado G68-1. F. Isolado G7-2. G. Isolado LV145. H. Isolado G85-1. B, E e F. Microscopia de luz e corado com Calcofluor. A, C, D, G e H. Microscopia de Interferência-Contraste. Escala de A a H=20 μm .

4.4 Taxa de esporulação

A interação isolados x tempos na avaliação da taxa de esporulação para ambos os grupos foi significativa ($P < 0,05$), indicando que a taxa de esporulação dos isolados não foi coincidente nos três tempos avaliados. Para os isolados de *C. lindemuthianum*, aos 14 dias não houve diferença nas médias dos isolados,

enquanto que aos 15 e 16 dias, os isolados foram separados em dois grupos distintos, no entanto, apenas o isolado LV153 foi separado dos demais, uma vez que apresentou maior esporulação. Para os isolados de *Colletotrichum* spp., tanto a avaliação aos 14 e 15 dias formaram quatro grupos, enquanto que aos 16 dias formou cinco grupos estatisticamente diferentes. Em ambos os grupos, aos 16 dias, as médias foram superiores aos demais dias (Tabela 3).

4.5 Germinação

Na avaliação da porcentagem de germinação de esporos, para ambos os grupos, a interação isolados x tempos foi significativa ($P < 0,05$), indicando que a porcentagem de germinação dos isolados não foi coincidente nos dois tempos avaliados. Portanto, a comparação entre as médias dos isolados foi realizada nos tempos de 24 e 48 horas separadamente. Para os isolados de *C. lindemuthianum*, a avaliação com 24 e 48 horas formaram três grupos distintos na comparação das médias, sendo que o isolado LV153 apresentou maior germinação tanto em 24 horas (44%) como com 48 horas (75,5%). Já os isolados LV145 e LV 238 apresentaram as menores taxas de germinação com 24 horas (2%) e 48 horas (25,5%), respectivamente. Para os isolados de *Colletotrichum* spp., a avaliação com 24 horas formou seis grupos distintos variando de 6% (G68-1) a 82,5% (G85-1), enquanto a avaliação com 48 horas formou sete grupos distintos com amplitude de variação de 26,5% (S2) a 93% (G86-1) (Tabela 3). Na germinação, foi analisada também a formação de septo e todos os isolados apresentaram esta característica (Figura 3). Vale ressaltar que nem todos os conídios germinados apresentaram septo, e o isolado S1, apresentou mais de um septo por conídio germinado, sendo observados zero, um, dois ou três septos quando germinavam (Gráfico 1).

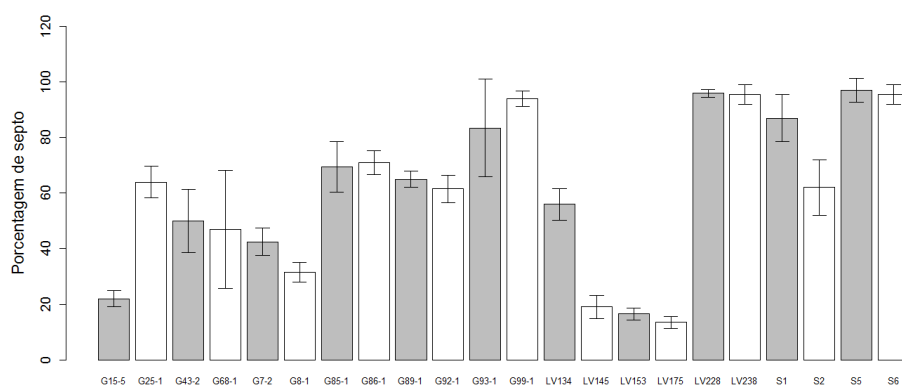


Gráfico 1 Porcentagem de conídios e ascósporos que apresentaram septo após a germinação, para os 22 isolados de *Colletotrichum* avaliados após 24 horas de incubação em água, corados com Calcofluor White

Nota: As barras representam o desvio padrão para os valores médios, considerando as duas repetições.

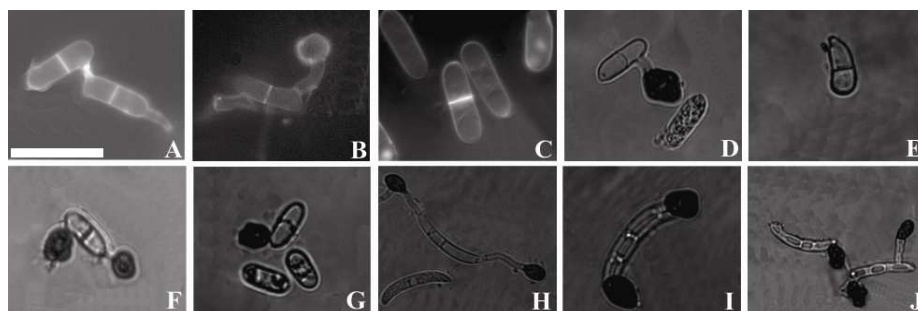


Figura 3 Conídios septados na germinação

Nota: A. Isolado G7-2. B. Isolado G43-2. C. Isolado G68-1. D. Isolado G85-1. E. Isolado LV228. F. Isolado S5. G. Isolado S6. H, I e J. Isolado S1. A, B, C. Microscopia de Luz e corado com Calcofluor. D a J. Microscopia de Interferência- Contraste. Escala de A a J=20 μ m.

4.6 Anastomose entre conídios

Todos os isolados avaliados de *C. lindemuthianum* apresentaram CATs e formaram três grupos distintos. A porcentagem de fusão variou de 1,5% (LV153) a 28,5% (LV134). Para o grupo de *Colletotrichum* spp. foram classificados em cinco grupos distintos e a porcentagem de fusão variou desde a ausência (G8-1, G43-2 e S1) até a formação de 83% de CATs para o isolado S6 (Figura 4) (Tabela 4).

Tabela 4 Morfologia de conídios e estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para dimensão dos conídios (μm), anastomose entre conídios (%) e germinação de conídios as 24 e 48 horas dias de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro

Isolado	Conídios	Tamanho conídios*		% de CAT's*	Germinação*	
		Largura	Comprimento		24h	48h
Isolados <i>C. lindeuthianum</i>						
LV134	Cilíndrico	3,78± 0,81B	15,24± 2,87B	28,5± 7,78 ^a	34,5± 4,94A	75,0± 2,82 ^a
LV145	Cilíndrico	3,94± 0,50B	17,47± 2,15A	11,0± 0,00B	2,0± 1,41 C	37,5± 2,12C
LV153	Cilíndrico	4,13± 0,59B	16,51± 1,70A	1,5± 0,71C	44,0± 5,66 C	75,5± 3,53 ^a
LV175	Cilíndrico	4,31± 0,91B	17,09± 2,24A	3,5± 0,71C	28,5± 3,53 B	53,5± 7,78B
LV228	Cilíndrico	5,98± 1,21A	12,58± 1,61C	12,5± 2,12B	25,5± 4,95B	32,0± 4,24C
LV238	Cilíndrico	6,09± 1,28A	17,01± 1,28A	13,0± 4,24B	24,0± 5,66B	25,5± 2,12C
Isolados <i>Colletotrichum</i> spp.						
G7-2	Cilíndrico	4,78± 0,71E	15,10± 5,66D	79,0±5,66 A	30,0 ± 4,24 D	86,5± 4,94 A
G8-1 ¹	Falciforme	9,30± 0,87A	22,59± 0,00B	Nf±0,00 E	34,5± 4,95 D	75,0± 9,89A
G15-5	Cilíndrico	2,93± 0,58G	9,05± 7,07H	14,0±7,07 E	21,5 ± 4,95 E	47,5± 6,36 E
G25-1	Cilíndrico	3,31± 0,73G	10,54± 8,49G	53,0±8,49 C	32,0 ± 5,65D	82,0± 9,89 A
G43-2 ¹	Falciforme	7,69± 0,87C	21,84± 0,00C	Nf±0,00 E	50,5 ±4,95C	87,5± 6,36 A
G68-1	Cilíndrico	4,04± 0,60F	15,39± 2,12D	10,5±2,12 E	6,0 ± 4,24F	39,0± 8,48 F
G85-1	Cilíndrico	5,13± 0,60E	15,07± 9,90D	67,0± 9,90 A	82,5± 10,61 A	92,0±5,66 A
G86-1	Cilíndrico	4,84± 0,85E	15,40± 1,41D	5,0± 1,41 E	79,5 ± 12,02A	93,0± 4,24A
G89-1	Cilíndrico	4,11± 0,60F	15,21± 5,66D	10,0± 5,65 E	67,0 ± 4,24 B	86,0± 1,41 A

“Tabela 4, conclusão”

Isolado	Conídios	Tamanho conídios*		% de CAT's*	Germinação*	
		Largura	Comprimento		24h	48h
Isolados <i>Colletotrichum</i> spp.						
G92-1	Cilíndrico	4,20± 0,72F	12,23± 4,24F	20,0±4,24 D	21,0 ± 4,24 E	65,5± 2,12 C
G93-1	Cilíndrico	4,16± 0,56F	11,00± 0,71G	8,5±0,71 E	44,5 ± 4,95 C	68,0± 1,41 C
G99-1	Cilíndrico	4,87± 0,73E	15,81± 11,3D	47,0±11,31 C	47,0 ± 8,48 C	88,0± 5,66 A
S1	Falciforme	4,81± 0,99E	28,94± 4,24A	Nf±0,00 E	54,5 ± 3,53C	90,5± 2,12 A
S2	Cilíndrico	6,25± 1,54D	13,91± 3,54E	22,5±3,54 D	17,5 ±3,53 E	26,5± 3,53 G
S5	Cilíndrico	6,45± 1,07D	14,12± 3,54E	27,5±3,54 D	37,5 ± 4,95D	60,0± 4,24 D
S6	Cilíndrico	8,26± 1,86B	14,13± 1,41E	83,0±1,41 A	49,0 ± 4,24 C	92,0± 1,41 A

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente (P<0,05), de acordo com o teste de Scott-Knott.

¹ Avaliação dos ascósporos.

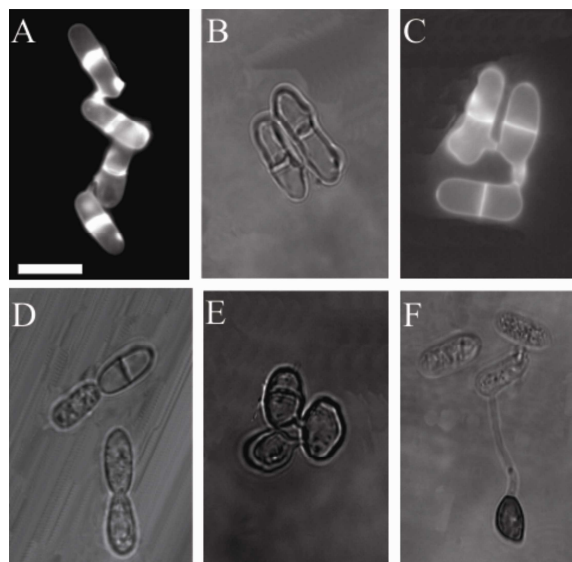


Figura 4 Formação de CATs

Nota: A. Isolado G68-1. B. Isolado G92-1. C. Isolado G7-2. D. Isolado LV228. E. Isolado S2. F. Isolado S6. A e C. Microscopia de luz corado com Calcofluor. B, D, E e F. Microscopia de Interferência-Contraste. Escala de A a F=20 μ m.

4.7 Teste de Patogenicidade

As raças dos isolados do Grupo *C. lindemuthianum* foram determinadas previamente (PINTO et al., 2012), assim como dos isolados G7-2, G8-1, G15-5, G25-1, G43-2, G68-1 que não causaram doença quando inoculados em cultivares de feijão (PINTO, 2012) (Tabela 1). Para os demais isolados foi realizado o teste de patogenicidade. Na avaliação da severidade da doença, houve interação cultivar x isolado ($P < 0,05$), assim o teste de médias foi realizado comparando-se a reação de cada cultivar em relação aos diferentes isolados. Para a maioria das cultivares os isolados foram classificados em dois grupos, exceto para as cultivares Majestoso de feijão e CD237 de soja que apresentaram três grupos (Tabela 5). No entanto, não houve separação entre

isolados oriundos de lesão de antracnose e oriundos de lesões de sarna. Além disso, o número de isolados dentro de cada grupo variou de acordo com as cultivares avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5 Notas médias da severidade da doença em cultivares de feijoeiro e de soja inoculadas com diferentes isolados de *Colletotrichum* pela relação isolado dentro da cultivar

Isolado	Cultivar*					
	Pérola	Majestoso	Talismã	CD237	Favorita	CD202
G85-1	1,95± 0,45B	2,67± 0,86C	4,89± 1,15 ^a	2,82± 0,91A	2,25±0,75 A	3,15± 0,50A
G86-1	3,72± 0,95A	4,14± 1,07B	5,43± 2,02 ^a	2,95± 1,02A	3,12± 0,93A	3,35± 0,77A
G89-1	2,87± 0,71A	4,44± 0,88A	2,92± 0,56B	2,69± 1,08A	2,84± 0,64A	3,50± 0,96A
G92-1	2,77± 0,72A	2,79± 0,72C	2,63± 0,62B	1,39± 0,23B	2,13± 0,57B	1,56± 0,40C
G93-1	4,17± 1,07A	3,37± 0,88B	4,11± 1,05 ^a	2,97± 0,74A	1,97± 0,37B	2,04± 0,62B
G99-1	3,34± 0,76A	3,60± 0,96C	3,78± 0,92 ^a	3,97± 1,21A	3,80± 1,31A	3,90± 1,21A
S1	1,90± 0,64B	2,18± 0,54C	2,51± 0,59B	2,38± 0,74A	1,84± 0,38B	2,60± 0,57A
S2	2,80± 0,81A	3,05± 0,91C	3,67± 1,18B	2,70± 0,57A	2,11± 0,52B	2,00± 0,41B
S5	2,93± 0,84A	3,12± 0,90C	3,44± 0,86B	2,15± 0,40B	2,25± 0,42A	2,06± 0,82A
S6	4,22± 1,26A	3,78± 1,05B	3,92± 0,99B	2,86± 0,81A	2,06± 0,48B	2,60± 0,62A

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo ($P<0,05$), de acordo com o teste de Scott-Knott.

- Nota média das cultivares

A interação isolados x dias também foi significativa ($P<0,05$), ou seja, o comportamento dos isolados não foi coincidente nas diferentes épocas de avaliação da severidade. Na avaliação da severidade da doença realizada aos sete dias após as inoculações verificou-se que os sintomas foram semelhantes entre os isolados avaliados (tabela 6). Na avaliação aos 10 e 14 dias foram formados dois grupos, no entanto, não houve separação entre isolados oriundos de lesão de antracnose e oriundos de lesões de sarna. Além disso, o número de isolados dentro de cada grupo variou de acordo com as épocas de avaliação e os isolados pertencentes a cada grupo (tabela 6). Aos 17 dias os isolados inoculados foram

classificados em quatro grupos na avaliação da severidade da doença, cujas notas variaram de 2, 210 (G92-1) a 3, 832 (G86-1). A partir dos resultados obtidos observa-se que houve progresso da severidade da doença para todos os isolados avaliados (Tabela 7) e, portanto os sintomas foram mais severos nesta época de avaliação. Os sintomas em caules e folhas de cultivares de soja e feijão causados por isolados oriundos de lesões de antracnose e sarna podem ser visualizados nas figuras 5, 6, 7 e 8. Os sintomas observados em caules e folhas das plantas de soja foram típicos da antracnose nesta espécie. Já os sintomas observados nos mesmos tecidos das plantas de feijão confundem-se com os sintomas típicos da antracnose e sarna nesta espécie. Estes resultados podem ser observados no campo, ou seja, no caule e folha os sintomas se confundem e na vagem podem ser observadas as duas doenças ocorrendo simultaneamente (Figura 9).

A avaliação das vagens da cultivar de feijão Talismã no final do ciclo mostrou a ocorrência de sintomas típicos da sarna do feijoeiro para todos os isolados avaliados (Figura 10). No entanto a intensidade de sintomas foi variável.

Tabela 6 Notas médias da severidade da doença de seis isolados de *Colletotrichum* avaliados aos 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação pela relação isolado dentro de dias

Isolado	Dias			
	7 dias	10 dias	14 dias	17 dias
G85-1	1,904± 0,77A	2,331±0,91 A	2,454± 0,87A	2,454± 0,87D
G86-1	1,516± 0,40A	2,089± 0,54 ^a	2,810± 1,27A	3,832± 1,21A
G89-1	1,699± 0,71A	2,334± 0,71 ^a	2,739± 0,78A	3,157± 0,78B
G92-1	1,242± 0,23A	1,445± 0,38B	2,037± 0,76B	2,210± 0,71D
G93-1	1,486± 0,52A	1,963± 0,56 ^a	2,482± 0,98A	3,202± 0,97B
G99-1	1,426± 0,38A	1,882± 0,56B	2,782± 0,62A	3,730± 0,58A
S1	1,263± 0,39A	1,784± 0,60B	2,141± 0,52B	2,265± 0,56D
S2	1,172± 0,19A	1,662± 0,28B	2,461± 0,57A	2,764± 0,69C
S5	1,463± 0,31A	1,645± 0,28B	2,510± 0,58A	2,750± 0,66C
S6	1,405± 0,29A	1,887± 0,40B	2,521± 0,46A	3,239± 1,05B

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo (P<0,05), de acordo com o teste de Scott-Knott. - Nota média das cultivares.

Tabela 7 Notas médias da severidade da doença de seis isolados de *Colletotrichum* avaliados aos 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação pela relação dias dentro de isolados

Isolado	Dias			
	7 dias	10 dias	14 dias	17 dias
G85-1	1,904± 0,77B	2,331±0,91 A	2,454± 0,87A	2,454± 0,87A
G86-1	1,516± 0,40D	2,089± 0,54C	2,810± 1,27B	3,832± 1,21A
G89-1	1,699± 0,71C	2,334± 0,71B	2,739± 0,78A	3,157± 0,78A
G92-1	1,242± 0,23B	1,445± 0,38B	2,037± 0,76A	2,210± 0,71A
G93-1	1,486± 0,52D	1,963± 0,56C	2,482± 0,98B	3,202± 0,97A
G99-1	1,426± 0,38D	1,882± 0,56C	2,782± 0,62B	3,730± 0,58A
S1	1,263± 0,39B	1,784± 0,60 ^a	2,141± 0,52A	2,265± 0,56A
S2	1,172± 0,19C	1,662± 0,28B	2,461± 0,57A	2,764± 0,69A

“Tabela 7, conclusão”

Isolado	Dias			
	7 dias	10 dias	14 dias	17 dias
S5	1,463± 0,31B	1,645± 0,28B	2,510± 0,58A	2,750± 0,66A
S6	1,405± 0,29D	1,887± 0,40C	2,521± 0,46B	3,239± 1,05A

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, pertencem ao mesmo grupo ($P<0,05$), de acordo com o teste de Scott-Knott.

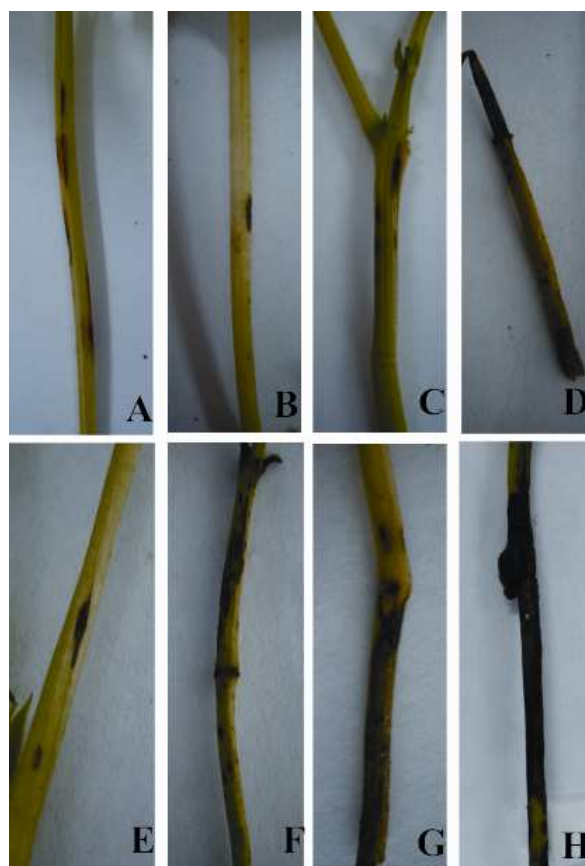


Figura 5 Sintoma causado por *Colletotrichum* em caules de feijão aos 17 dias após a inoculação na cultivar Majestoso

Nota: A. Isolado G99-1. B. Isolado S5. C. Isolado S2. D. Isolado G86-1. E. Isolado G89-1. F. Isolado G92-1. G. Isolado G93-1. H. Isolado LV238.

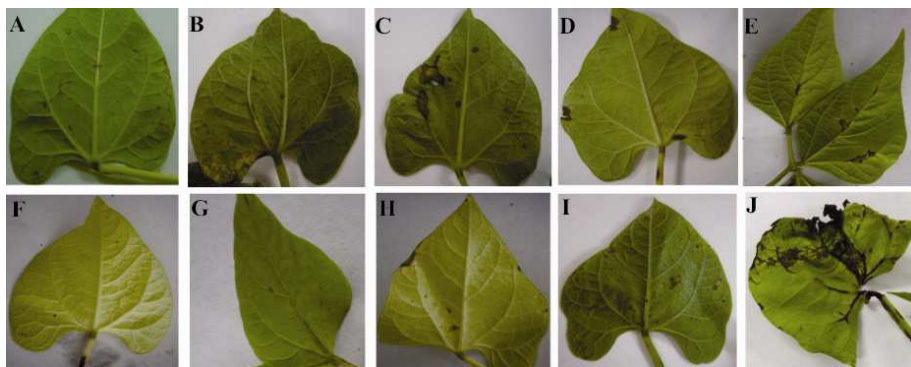


Figura 6 Sintoma causado por *Colletotrichum* em folha de feijão aos 17 dias após a inoculação na cultivar Majestoso

Nota: A. Isolado G99-1. B. Isolado S1. C. Isolado S2. D. Isolado S5. E. Isolado G86-1. F. Isolado G85-1. G. Isolado G92-1. H. Isolado G93-1. I. Isolado S6. J. Isolado LV238.

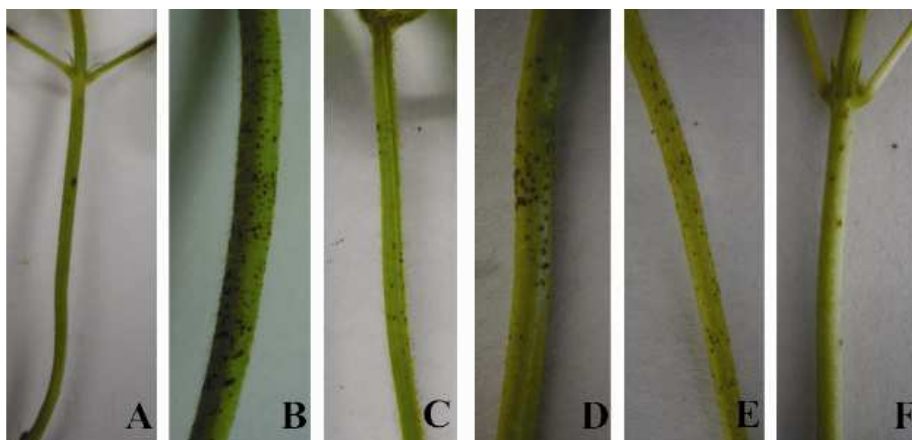


Figura 7 Sintoma da doença causada por *Colletotrichum* no caule da soja aos 17 dias após a inoculação na cultivar CD237

Nota: A. Isolado S6. B. Isolado G99-1. C. Isolado G93-1. D. Isolado G85-1. E. Isolado G86-1. F. Isolado G92-1.

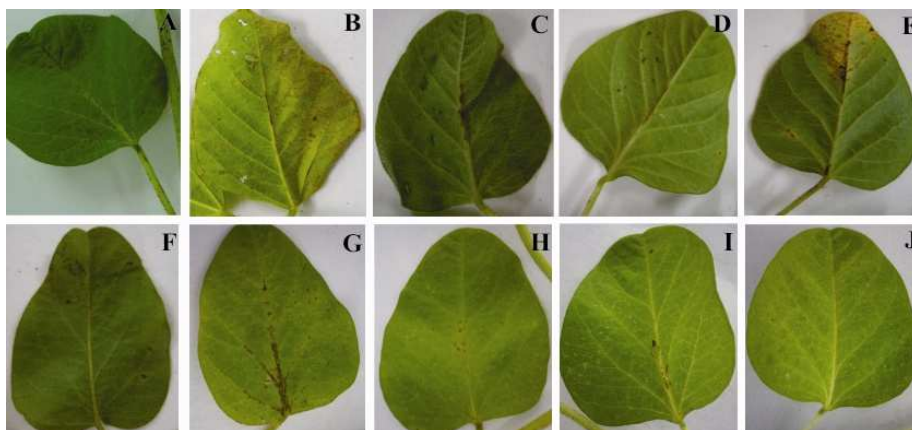


Figura 8 Sintoma causado por *Colletotrichum* em folha de soja aos 17 dias após a inoculação na cultivar CD237

Nota: A- Isolado G99-1. B- Isolado G92-1. C- Isolado S2. D- Isolado S5. E- Isolado S6. F- Isolado S1. G- Isolado G85-1. H- Isolado G86-1. I- Isolado G89-1. J- Isolado G93-1.



Figura 9 Plantas do feijoeiro infectadas naturalmente

Nota: A. Vagem com sintoma de sarna e presença de acervulos indicados pela seta. B. Parcela tomada pelas doenças. C e E. Sintomas numa mesma vagem de antracnose (lesões arredondadas) e sarna (manchas negras). D. Caules infectados com as doenças, não conseguindo distinguir a antracnose da sarna.



Figura 10 Sintoma causado por *Colletotrichum* em vagens de feijão da cultivar Talismã

Nota: A. Isolado G89-1. B. Isolado G86-1. C. Isolado G99-1. D. Isolado G85-1. E. Isolado G92-1. F. Isolado 93-1. G. Isolado S1. H. Isolado LV238. Setas na Figura H indica a lesão de antracnose.

4.8 PCR gene Mating type

Na análise do PCR, apenas os isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* amplificaram a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* (GARCÍA-SERRANO et al., 2008), confirmando a espécie. Quando os isolados foram testados com o par de *primers* específico para a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* desenvolvido por Barcelos, Souza e Silva (2011),

amplificaram apenas os isolados G7-2, G8-1, G15-5, G25-1, G43-2, G68-1. No entanto, na avaliação com o par de *primers* específicos para *Glomerella truncata*, CT21HMGF e CT21HMGR, desenvolvidos por Menat et al. (2012), todos os isolados amplificaram.

4.9 Marcador IRAP

Nas análises de IRAP, dos dois pares de *primers* testados, ambos exibiram polimorfismo, amplificando um total de 49 bandas polimórficas, gerando, 24 bandas polimórficas para o primer Irap1/Irap4 e 25 bandas polimórficas para o primer Irap2/Irap4 (Figura 12). Com base nas 49 bandas polimórficas, foi construída uma matriz de similaridade genética e foram obtidas as estimativas das similaridades genéticas, que variaram de 0, 217 a 1,0. Para melhor visualização foi construído um dendograma. A linha de corte dada pela estimativa de *sgm* e foi de 0, 75037. Pela análise do dendograma foi possível observar a formação de 14 grupos de similaridade (Figura 11).

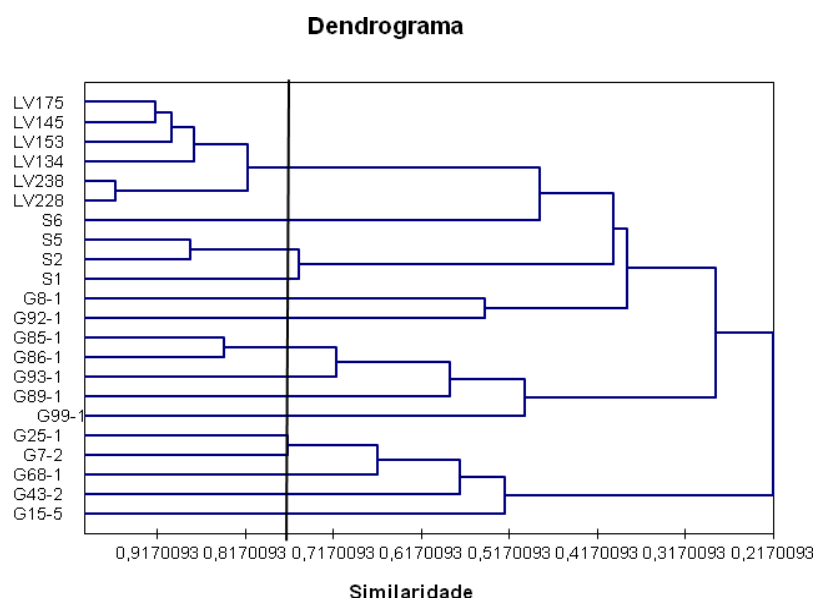


Figura 11 Dendrograma de similaridade genética usando marcados IRAP de 22 isolados de *Colletotrichum*.

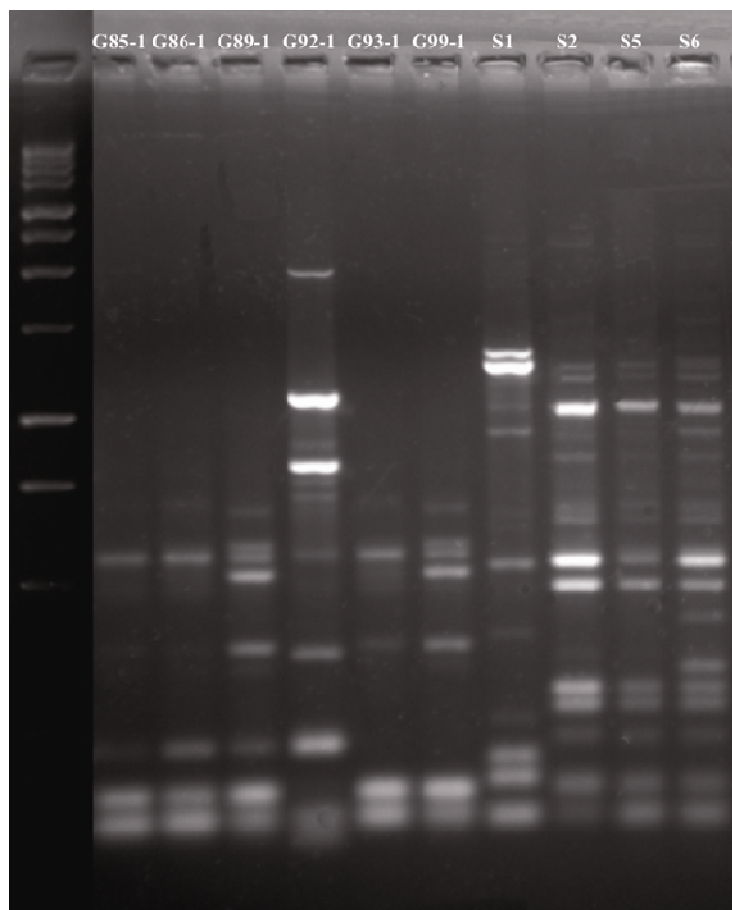


Figura 12 Perfil de bandas polimórficas para o par de *primers* IRAP2/IRAP4 para os isolados que causaram a sarna no feijoeiro

Para tentar comprovar o teste de patogenicidade, ou seja, que os sintomas foram causados pelos isolados, foi realizado o reisolamento das lesões das folhas, caules e vagens das diferentes cultivares para todos os isolados inoculados. Após o reisolamento, o DNA foi extraído e todos os isolados utilizados na inoculação e todos os obtidos pelo reisolamento, foram submetidos ao marcador IRAP. Os amplicons foram avaliados e o mesmo perfil de bandas

foi obtido tanto para o isolado inoculado como para o obtido no reisolamento (Figura 13).

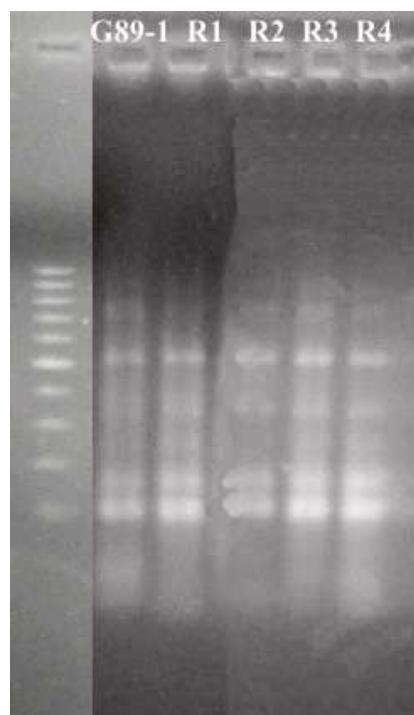


Figura 13 Perfil de Bandas IRAP para o isolado inoculado G89-1 e os obtidos por reisolamento (R1, R2, R3 e R4)

4.10 Compatibilidade Sexual e Micelial

Na análise de compatibilidade micelial, foram estimadas as proporções de reações compatíveis para cada isolado (Tabela 8), tendo o isolado G86-1 apresentado 31,82% de compatibilidade com os outros isolados. Já alguns isolados não apresentaram compatibilidade. As estimativas de similaridade variaram de 0 a 0,27 e a linha de corte (sgm) foi de 0,95. A partir do

dendograma obtido pela análise de agrupamento (Figura 15), foram formados 22 grupos diferentes, ou seja, cada isolado foi representado por um grupo distinto. Entre os pares de isolados que apresentou compatibilidade micelial, cinco pares formaram peritécios com ascos e ascósporos na linha de contato entre as colônias: G92-1/S2; S2/S5, S2/S6, S6/S5, G8-1/G7-2 (Figura 14).

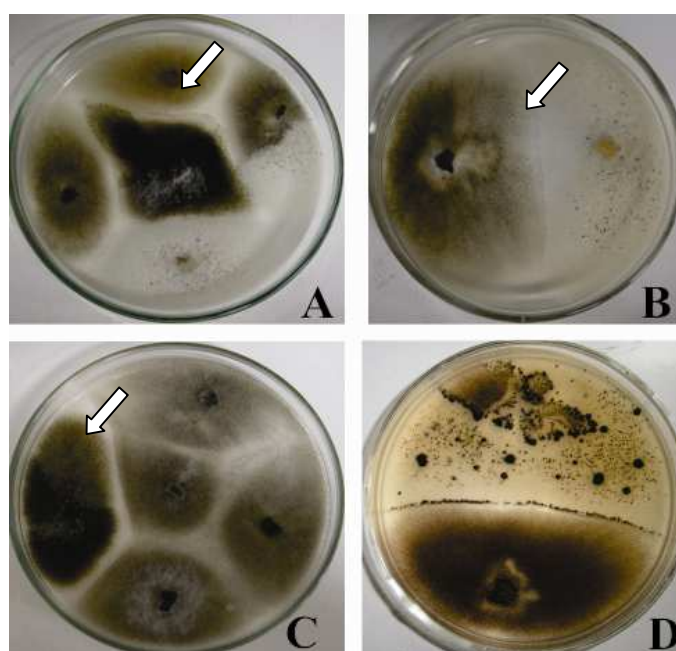


Figura 14 Placas dos pareamentos mostrando a linha de contato e a formação de peritécios

Nota: A. Isolado central G92-1 e formando linha com peritécios com isolado S2. B. Pareamento entre os isolados S2 e S5. C. Isolado central G89-1 e formando compatibilidade micelial com os isolado: acima com ele mesmo, à direita com o isolado G99-1 e abaixo com o isolado G93-1. D. Pareamento entre os isolados S5 e S6. Nas setas das figuras A e B indicam a formação da linha com peritécios. A seta na figura C indica a incompatibilidade entre os micélios, o que não é visto nos demais pareamentos da imagem.

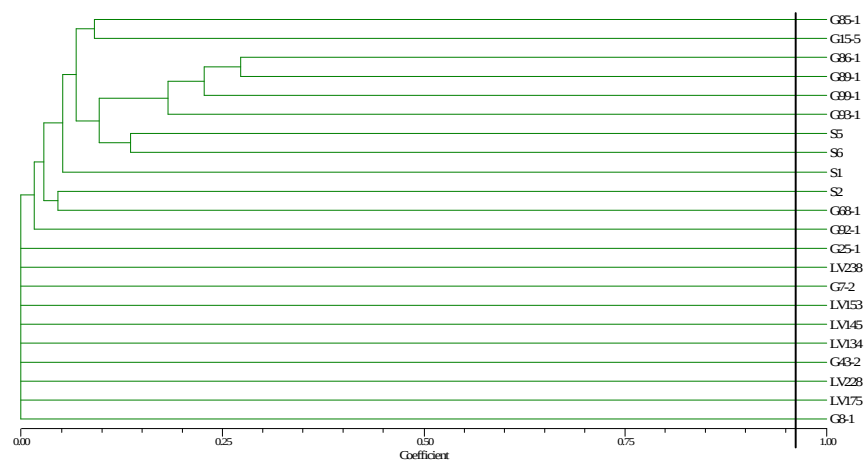


Figura 15 Dendograma de similaridade para a compatibilidade entre os 22 isolados de *Colletotrichum*

Tabela 8 Reações de compatibilidade entre os 22 isolados de *Colletotrichum* e a proporção de reações compatíveis (%) para cada isolado

	G85-1	G86-1	G89-1	G92-1	G93-1	G99-1	S1	S2	S5	S6	G7-2	G8-1	G15-5	G25-1	G43-2	G68-1	LV 134	LV145	LV153	LV175	LV 228	LV 238	%
G85-1-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,09
G86-1	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,82
G89-1			+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,27
G92-1				-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,09
G93-1					+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,18
G99-1						+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,27
S1							-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,55
S2								-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,64
S5									-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,73
S6										-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	22,73

“Tabela 8, conclusão”

	G85-1	G86-1	G89-1	G92-1	G93-1	G99-1	S1	S2	S5	S6	G7-2	G8-1	G15-5	G25-1	G43-2	G68-1	LV 134	LV145	LV 153	LV175	LV 228	LV 238	%
G7-2											-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,55	
G8-1												-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,55	
G15-5													-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,64	
G25-1														-	-	-	-	-	-	-	-	0	
G43-2															-	-	-	-	-	-	-	0	
G68-1																-	-	-	-	-	-	0	
LV134																	-	-	-	-	-	0	
LV145																		-	-	-	-	0	
LV153																			-	-	-	0	
LV175																				-	-	0	
LV228																					-	0	
LV238																						-	0

+ compatível; - incompatível.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm investigado isolados obtidos de lesões de antracnose do feijoeiro e nos isolamentos têm sido obtidas colônias conidiais típicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e também colônias periteciais semelhantes à *Glomerella* (BARCELOS, 2010; ISHIKAWA et al., 2010b; PINTO, 2012; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010). A avaliação destes isolados por meio de caracteres morfológicos e moleculares tem mostrado grande variabilidade, indicando se tratar de outra/s espécie/s (BARCELOS, 2010; BARCELOS; SOUZA; VAILLANCOURT, 2011; ISHIKAWA et al., 2010b; PINTO, 2012). No presente estudo, foram avaliados isolados de *C. lindemuthianum*, isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro. De um modo geral observou-se grande variabilidade para todos os caracteres avaliados entre e dentro de dos grupos de isolados analisados.

Com relação às características IVCm e do diâmetro colonial foram observadas diferenças significativas ($P < 0.05$). Para a população de *C. lindemuthianum*, essa variabilidade já havia sido relatada por Liu et al. (2013), Pinto et al. (2012) e Souza, Souza e Mendes-Costa (2007).

Analisando-se os resultados apresentados neste estudo, pode-se notar que a diferença entre o IVCm médio da população de *C. lindemuthianum* (2,56 mm/dia) e da população de *Colletotrichum* spp. (10,07 mm/dia) foi muito discrepante, esse resultado também foi observado por Pinto (2012) utilizando isolados oriundos de lesões de antracnose. Chama a atenção que apesar da formação de diferentes grupos pelo teste de médias envolvendo os isolados de lesões de antracnose e sarna não há uma nítida separação entre os isolados oriundos das lesões das duas doenças. Na população de *C. lindemuthianum* a avaliação do diâmetro colonial foi realizada aos 15 dias do início do

experimento, enquanto que na população de *Colletotrichum* spp., foi aos oito dias de crescimento, pois 50% dos isolados já haviam atingido o diâmetro máximo da placa de Petri. Há relatos na literatura de isolados de *C. truncatum* oriundos de culturas de lentilha, soja, amendoim entre outras, um crescimento variando de 2 a 8,6 mm/dia (DAMM et al., 2009; FORD et al., 2004).

A análise de caracteres morfológicos é útil na caracterização de isolados da espécie, auxiliando nas análises genéticas quando são identificados isolados contrastantes para as características, e também na diferenciação do gênero (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Para os isolados da população de *C. lindemuthianum*, os conídios apresentaram uma amplitude de variação para o comprimento (12,58-17,47 μm) e largura (3,78-6,09 μm), estes valores estão em concordância com outros dados descritos na literatura para a espécie (LIU et al., 2013; O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; PINTO et al., 2012; ROCA et al., 2003). Para os isolados pertencentes à população de *Colletotrichum* spp., o isolado S1 apresentou formato falciforme e tamanho 24,94 x 4,81 μm , estes valores estão em concordância com dados descrito na literatura para a espécie *C. truncatum* isolados de diferentes hospedeiros (DAMM et al., 2009; FORD et al., 2004). O tamanho dos ascósporos dos isolados G43-2 (21,84 x 7,69 μm) e G8-1 (22,59 x 9,3 μm) e está de acordo com os descritos anteriormente na literatura para a espécie *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (CASTRO; MENDES-COSTA; SOUZA, 2006; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007), no entanto, valores acima aos relatados por Kimati e Galli (1970) e Rodrigues-Guerra et al. (2005).

Caracteres fisiológicos podem auxiliar diretamente na classificação dos isolados que possuem maior facilidade no estabelecimento na superfície do seu hospedeiro, ou seja, é importante para entendimento dos eventos de pré e pós-infecção do hospedeiro pelo patógeno (BARCELOS, 2010; ISHIKAWA et al., 2010b). Neste estudo, altos níveis de diversidade foram detectados na análise da

germinação de conídios e ascósporos da população de *Colletotrichum* spp. e conídios da população de *C. lindemuthianum*, inclusive entre os dois tempos avaliados (24 horas e 48 horas), para ambas as populações. A germinação média para ambos os tempos foi maior para a população de *Colletotrichum* spp., como já havia sido relatado por Ishikawa et al. (2010b), Pinto (2012) e Pinto et al. (2012) para isolados oriundos de antracnose. A taxa de esporulação de um patógeno influencia na determinação da sua capacidade de dispersão, afetando a distribuição espacial da espécie (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). Além disso, é relatado na literatura que *C. lindemuthianum* tem limitada capacidade de dispersão, que ocorre preferencialmente entre diferentes partes da mesma planta e ocasionalmente entre plantas adjacentes (SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010). Os isolados da população de *C. lindemuthianum*, apresentaram baixa esporulação, isso ocorreu, pois a melhor maneira dessa espécie esporular é por meio de vagens. Para ambos os grupos, o melhor tempo de esporulação foi aos 16 dias e pode-se observar também, que os isolados que causam a sarna, possuem uma maior taxa de esporulação.

Na literatura é relatada a ausência de septo para *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo este fenótipo considerado na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (BAILEY; JEGUER, 1992; LIU et al., 2013). Entretanto, essa concordância com a literatura não foi observada para os isolados de *C. lindemuthianum*, uma vez que todos os isolados analisados apresentaram porcentagens variáveis de septo quando os conídios germinaram. A ocorrência de septo em *C. lindemuthianum* tem sido relatada por Pinto et al. (2012). O isolado S1, de formato falcado, formou septo assim como relatado na literatura para *C. truncatum* (DAMM et al., 2009).

A avaliação da patogenicidade dos fitopatógenos é uma análise essencial para monitorar a variabilidade de uma espécie e determinar a importância da mesma para a cultura afetada pela doença. Os testes de patogenicidade para *C.*

lindemuthianum são importantes e bem estabelecidos na literatura (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Os isolados G85-1, G86-1, G89-1, G92-1, G93-1 e G99-1, obtidos de lesões de antracnose, têm sido previamente avaliados quanto à patogenicidade seguindo a metodologia utilizada para a avaliação da severidade da antracnose (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987) e apresentaram sintomas brandos da doença (PINTO, 2012). No presente estudo, esses isolados juntamente com os isolados S1, S2, S5 e S6 oriundos de lesões de sarna, foram inoculados em cultivares adaptadas de feijão e de soja. Estes isolados causaram sintomas nas folhas e nos caules do feijoeiro que foram confusos, pois se assemelharam aos da antracnose e da sarna. No entanto, os sintomas nas cultivares de soja foram semelhantes aos da antracnose. Quando as vagens foram avaliadas, as lesões apresentadas foram típicas de sarna. Estes resultados também podem ser comparados com os sintomas avaliados no campo naturalmente, uma vez que nos caules e nas folhas as doenças não são possíveis separar as doenças, no entanto, nas vagens elas se distinguem e na mesma planta podem ser observadas as duas doenças (Figura 15). Observou-se também que a doença se manifesta mais tardiamente que as lesões de antracnose nas folhas e caules do feijoeiro. Estes resultados evidenciam que diferentes espécies de *Colletotrichum* coabitam lesões, e situação semelhante foi relatada em feijão-caupi por Latunde-Dada et al. (1999), que observaram que a partir de lesões de antracnose, mais de uma espécie de *Colletotrihum* foi identificada. Todos os isolados avaliados, a exceção dos isolados de *C. lindemuthianum*, causaram sintomas de antracnose nas cultivares de soja. No entanto, apenas um dos isolados apresentou conídio falcado, semelhante ao de *C. truncatum*, relatado como o agente causal da antracnose da soja. Este resultado também evidencia que diferentes espécies de *Colletotrichum* podem causar a antracnose da soja.

Entre os mecanismos que podem auxiliar na geração dessa variabilidade demonstrada para os caracteres analisados neste estudo destacam-se a

recombinação sexual (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010), o ciclo parassexual (CASTRO-PRADO et al., 2007) e a recombinação assexual via fusão de CATs (ISHIKAWA et al., 2010a; ROCA et al., 2003), entre outros. Com relação à recombinação sexual dos isolados, apenas 11,69% das combinações apresentaram compatibilidade sexual, no entanto, nenhum dos isolados de *C. lindemuthianum* foram compatíveis. Das combinações compatíveis, apenas cinco combinações apresentaram produção de ascos e ascósporos. Estudos com a fase sexual do gênero *Colletotrichum*, indicam que o controle genético da reprodução neste patógeno não correspondente a um sistema de acasalamento simples, e provavelmente mais de um loco no genoma está envolvido neste controle (BAILEY; JEGGER, 1992; VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000). Apesar da produção de peritécios, não se pode afirmar que esteja ocorrendo cruzamento entre estes isolados. Existe a possibilidade que esses peritécios estejam sendo produzidos por um dos isolados, devido à indução por meio de moléculas produzidas pelo outro isolado usado no pareamento, havendo a ativação de alguma rota metabólica anteriormente bloqueada (WEBER; WEBSTER, 1998). Chama a atenção, a ocorrência de compatibilidade entre isolados G92-1 e S2, pois estes isolados são oriundos de lesões de antracnose e sarna respectivamente. Quando os isolados foram agrupados, cada isolado deu origem a um grupo diferente, ou seja, foram dissimilares.

Uma via alternativa para recombinação assexual entre isolados incompatíveis tem sido sugerida por Ishikawa et al. (2012) por meio da formação de CATs. Neste estudo foi observado que a fusão de CATs foi comum para a maioria dos isolados (90,9%), não sendo observado apenas entre ascósporos. Considerando que os CATs tenham um papel importante na dinâmica populacional dos fitopatógenos, a alta frequência pode estar influenciando significativamente a variabilidade do patógeno nas populações

analisadas. Neste estudo verificamos que seis isolados apresentam uma proporção de formação de CATs superior a 25%, e dentre eles estão isolados que causam antracnose no feijoeiro (LV134), sarna no feijoeiro (G85-1, G99-1 e S6) e também isolados que não foram patogênicos (G7-2 e G25-1). Entre esses isolados, o G85-1, S6, G7-2 e G25-1, apresentaram porcentagens de formação de CATs superior a 50%, semelhante aos valores encontrados na literatura para *C. lindemuthianum* por Pinto et al. (2012). Estes isolados podem ser utilizados em estudos futuros visando elucidar a função dos CATs e a sua formação entre diferentes espécies.

Essa ampla variabilidade encontrada neste estudo, provavelmente é devida à presença de múltiplas espécies de *Colletotrichum*. Dados moleculares foram obtidos para tentar separar os isolados avaliados em diferentes espécies. García-Serrano et al. (2008) desenvolveram um par de *primers* específico para *C. lindemuthianum*, que amplifica a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* do patógeno. De todos isolados avaliados, apenas os seis pertencentes à população de *C. lindemuthianum*, que causam sintomas típicos de antracnose do feijoeiro, amplificaram quando testados com este par de *primers*, confirmando que pertence à espécie. Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), após trabalhar com isolados teleomórficos da espécie *C. lindemuthianum*, que também não amplificaram para o par de *primers* descrito por García-Serrano et al. (2008), desenvolveram um segundo par de *primers* que amplificou para a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* dos isolados periteciais analisados pelas autoras. Dos isolados estudados, apenas seis isolados (G7-2, G8-1, G15-5, G25-1, G43-2 e G68-1), amplificaram a banda correspondente, quando testados com os *primers* citados anteriormente, corroborando a hipótese de que estes isolados da população sexual não são relacionados com os isolados da população assexual, quando se consideram estas análises da região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*. Menat et al., estudando a *Glomerella truncata*, desenvolveram um

par de *primers* específico para a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*, no entanto, quando os 22 isolados foram testados, todos foram amplificados, dessa forma, podemos concluir que esses *primers* não foram específicos.

Os marcadores IRAP/REMAP têm sido utilizados para separar diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* (SANTOS et al., 2012) por meio do RetroCl1 (retroelemento *Colletotrichum lindemuthianum* 1). No presente trabalho, na análise de IRAP os isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* formaram um grupo distinto. O isolado S6 formou um grupo sozinho, no entanto, um grupo irmão dos isolados de *C. lindemuthianum*. Os isolados S2 e S5 formaram um terceiro grupo, sendo irmão do grupo formado pelo isolado S1. Os demais isolados que causam sarna formaram grupos distintos, com exceção do G85-1 e G86-1 que estão no mesmo grupo. Dos isolados que não causaram doença, três formaram apenas um grupo (G68-1, G7-2 e G25-1) e os demais, cada isolado formou um grupo distinto. Pode-se notar que a maior dissimilaridade foi entre os isolados que não causaram doença com os isolados que causaram, podendo inferir que esses isolados patogênicos possuem características semelhantes que foram detectadas pelo marcador de retrotransposons.

Este trabalho fornece o primeiro estudo detalhado de várias espécies de *Colletotrichum* encontradas no feijoeiro comum e envolvendo vários caracteres. Os resultados obtidos mostram que uma análise filogenética molecular deverá ser realizada para identificar as diferentes espécies de *Colletotrichum* que infectam o feijoeiro causando a antracnose e a sarna. Além disso, esses resultados corroboram com a literatura que relata a ocorrência de diferentes complexos no gênero *Colletotrichum* o que dificulta a identificação das diferentes espécies que causam doenças em diferentes hospedeiros (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009; LATUNDE-DADA et al., 1999; LIU et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

- a) Os isolados de *Colletotrichum* que coabitam lesões de antracnose apresentaram ampla variabilidade para todas as características avaliadas, evidenciando a ocorrência de múltiplas espécies.
- b) A avaliação da severidade da doença causada pelos isolados de *Colletotrichum* spp. deve ser realizada tardiamente, ou seja, aos 17 dias.
- c) Apenas os isolados de *C. lindemuthianum* foram agrupados pelo marcador IRAP.
- d) O crescimento micelial de *C. lindemuthianum* é bem mais lento que dos demais isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 581 p.

ANDERSON, K. L. **Pathogenic variation and host specificity of *Colletotrichum truncatum* from lentil**. 2003. 111 p. Thesis (Ph.D. in Sciences) - University of Saskatchewan, Saskatoon, 2003.

ARX, J. A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 9, p. 413- 468, 1957.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismo**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.

_____. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S. O. P. (Ed.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo: Manole, 1987. p. 393-407.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Documentos, 272).

BARCELOS, Q. de L. **Análise dos eventos de pré e pós penetração de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro**. 2010. 62 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; SILVA, K. J. D. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 230-242, Jan./Feb. 2011.

BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 14. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 525 p.

BOYETTE, C. D. Host range and virulence of *Colletotrichum truncatum*, a potential mycoherbicide for hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). **Plant Disease**, Quebec, v. 75, n. 1, p. 62-64, Jan. 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cultura do feijão**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

BUIATE, E. A. S. et al. O gênero *Colletotrichum* em plantas cultivadas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, n. 1, p. 211-255, ago. 2009.

CAMARGO JÚNIOR, O. A. et al. Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 607-615, May/June 2007.

CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum*: current status and future directions. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 73, n. 1, p. 181-213, Sept. 2012.

CASTRO, R. A.; MENDES-COSTA, M. C.; SOUZA, E. A. Dimorfismo de ascósporos de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 598-600, nov./dez. 2006.

CASTRO-PRADO, M. A. A. et al. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 634-642, May/June 2007.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). **Genome Biology**, London, v. 48, n. 5, p. 943-945, Oct. 2005.

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol**: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53.

COSTA, J. L. S. et al. **Quem causa sarna**. Pelotas: Cultivar, 2001. 8 p.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, out./dez. 2003.

DAMM, U.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodyplodia plurivora* sp. nov. **Mycologia**, New York, v. 99, n. 5, p. 664-680, Oct. 2007.

DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 39, n. 1, p. 45-87, Dec. 2009.

DEAN, R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 4, p. 414-430, Apr. 2012.

DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, Durham, v. 26, n. 3, p. 297-302, July 1945.

DYKE, C. G. van; MIMS, C. W. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 69, n. 11, p. 2445-2467, Nov. 1991.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 8, p. 539-548, Jan. 2010.

EDGERTON, C. W. Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 1, n. 5, p. 244-254, 1914.

FORD, R. A. et al. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 33, n. 4, p. 559-569, Dec. 2004.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1 Fifteen proteins and anRNA. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 1-25, 1998.

GALLI, J. A.; PANIZZU, R. de C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, abr./jun. 2007.

GAN, P. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 197, n. 4, p. 1236-1249, Dec. 2013.

GARCÍA-SERRANO, M. et al. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 312-317, Sept. 2008.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 165-186, 2000.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Genetic control on the performance of common bean differential cultivars to *Colletotrichum lindemuthianum* races. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 4, p. 579-586, 2007.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, London, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, 1970.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Confronto das safras de 2010 e 2011, Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 31175, Feb. 2012.

_____. Livecell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2-9, Jan. 2010a.

_____. Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 270-257, Aug. 2010b.

ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 461-464, Feb. 2011.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 1, p. 323-329, Nov. 2006.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas de seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 31, n. 177, p. 322-331, 1984.

KALENDAR, R. The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. **Ratarstvo i Povrtarstvo**, Novi Sad, v. 48, n. 2, p. 261-274, 2011.

KALENDAR, R. et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 1, p. 704-711, Nov. 1999.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 5, p. 2478-2484, Aug. 2006.

KAUFMAN, B.; RICHARDS, S.; DIERIG, D. A. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 111-114, Apr. 1999.

KIM, F. J. et al. Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. **Virology**, London, v. 318, n. 1, p. 183-191, Jan. 2004.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 690 p.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. Et v. Scherenk. f. sp. *phaseoli* n. f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, n. 27, p. 411-437, 1970.

KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 158-164, June 2001.

LATUNDE-DADA, A. O. et al. Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 48, n. 6, p. 777-784, Jan. 1999.

LENN, J. M.; BROWN, A. E. Factors influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaf surfaces of *Stylosanthes guianensis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 227-232, 1991.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, n. 1, p. 2336-2342, 1993.

LIU, F. et al. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. **Micology**, Wageningen, 2013. In press.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Cambridge, v. 110, n. 3, p. 253-263, June 2004.

MENAT, J. et al. Mating system of *Glomerella truncata*: another *Glomerella* species with an atypical mating system. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 3, p. 641-649, May/June 2012.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum* Teleomorfo: *Glomerella*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 3, n. 1, p. 170-179, Aug. 2006.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CABI, 1992. p. 269-288.

MOTA, S. F. **Análise morfológica, fisiológica e patogênica de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli***. 2011. 48 p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MURATA, H. et al. Traceability of Asian Matsutake, specialty mushrooms produced by the ectomycorrhizal basidiomycetes *Tricholoma matsutake*, on the basis of retroelement-based DNA markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 7, p. 2023-2031, Apr. 2008.

O'CONNEL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: PRUSKY, D.; RUMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host- pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 57-77.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 27, p. 75-98, 1985.

O'CONNELL, R. J.; NASH, C.; BAILEY, J. A. Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 67-87.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PAULA JÚNIOR, T. J.; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata, 2012. 157 p.

PEARCE, S. R. et al. The Tyl-copia group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. **Molecular Genetics & Genomics**, Berlin, v. 205, n. 1, p. 305-315, Feb. 1996.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, nov./dez. 2006.

PEREIRA, R. et al. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 224-225, 2010.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July/Aug. 1999.

PINTO, J. M. A. **Variabilidade de isolados sexuais e assexuais de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2012. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 490-497, May 2012.

_____. Pathogenicity and virulence structure of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 228-229, 2010.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

ROCA, M. G. et al. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 4, n. 2, p. 911-919, Aug. 2005.

_____. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, Nov. 2004.

_____. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 138-145, Nov. 2003.

RODRÍGUEZ-GUERRA, R. et al. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 4, p. 793-803, July/Aug. 2005.

_____. Variation in genotype, pathotype and anatomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 52, n. 2, p. 228-235, Apr. 2003.

ROHLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter, 2000. Software.

RUSSEL, P. F.; RAO, T. R. On habitat and association of species of anopheline larvae in south-eastern Madras. **Journal of Malaria India Institute**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 153-178, Aug. 1940.

SABOT, F.; SCHULMAN, A. H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. **Heredity**, Cary, v. 97, n. 6, p. 381-388, Sept. 2006.

SANMIGUEL, P. et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, New York, v. 274, n. 5288, p. 765-768, Nov. 1996.

SANTANA, M. F. et al. Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, n. 9999, p. 1-5, 2013.

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 457-477.

_____. Determinação da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 114-116.

SANTOS, L. V. et al. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 1087-1095, Mar. 2012.

SAUPE, S. J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. **Microbio Genome Res. logy and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, June 2000.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis. Version 2.0. Geneva: University of Geneva, 2000. Software.

SCHWARTZ, H. F. Anthracnose. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean disease**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1994. p. 16-17.

SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system the evaluation of bean germoplasm**. Cali: CIAT, 1987. 54 p.

SHARMA, K. R. et al. Isolation of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from *Salacia chinensis* and its antifungal sensitivity. **Journal of Phytology**, Humnabad, v. 3, n. 6, p. 20-22, 2011.

SHIRASU, K. et al. A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 7, p. 908-915, July 2000.

SILVA, K. J. D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 4, p. 241-247, Apr. 2007.

SINCLAIR, J. B. Anthracnose of soybeans. In: WYLLIE, T. D.; SCOTT, D. H. (Ed.). **Soybean diseases of the North Central Region**. Saint Paul: APS, 1988. p. 92-95.

SOUZA, B. O. **Variabilidade genética em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *Phaseoli*) por meio de marcadores morfológicos**. 2005. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 2007.

SOUZA, E. A. D.; CAMARGO JÚNIOR, O. A.; PINTO, J. M. A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, Jan. 2010.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 265-281, Oct. 1992.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

_____. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

TALHINHA, S. P. et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 9, p. 986-996, Sept. 2002.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

VAILLANCOURT, L.; WANG, J.; HANAU, R. *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction: genetic regulation of sexual compatibility. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Glomerella graminicola**. Saint Paul: APS, 2000. p. 29-44.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600 p.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. de O. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1993. 131 p.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control england. Wallingford: CAB International, 1992. p. 167-185.

WEBER, R. W. S.; WEBSTER, J. Stimulation of growth and reproduction of *Sphaeronaemella fimicola* by other coprophilous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 9, p. 1055-1061, Sept. 1998.

WESSLER, S. R. Eukaryotic transposable elements: teaching old genomes new tricks. In: _____. **The implicit genome**. Oxford: Oxford University, 2006. p. 138-165.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, n. 12, p. 973-982, Dec. 2007.